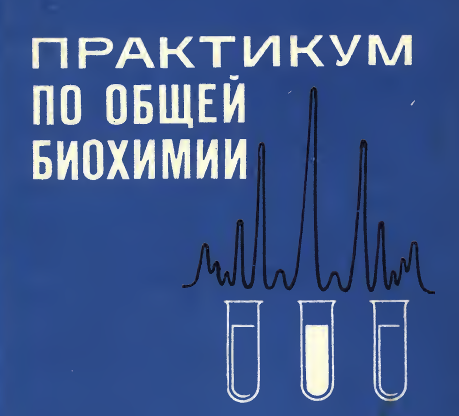
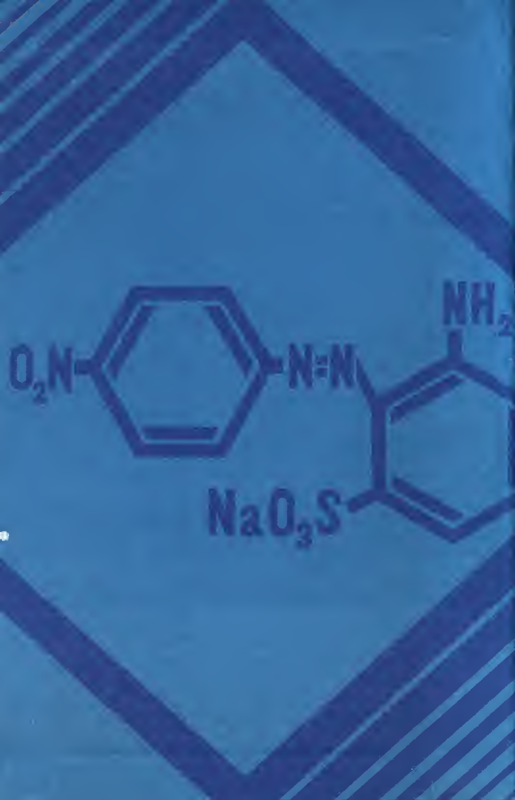
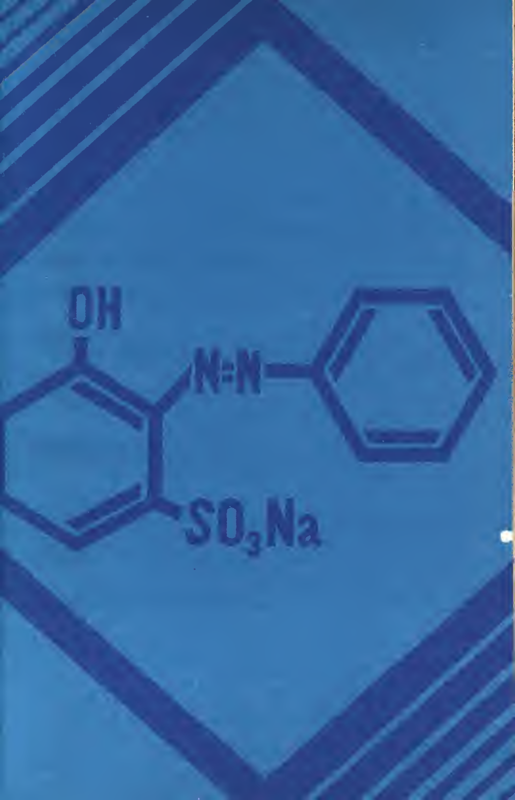
Ю. Б. ФИЛИППОВИЧ
Т. А. ЕГОРОВА
Г. А. СЕВАСТЬЯНОВА

ПРАКТИКУМ ПО ОБЩЕЙ БИОХИМИИ




O2N
N=N
NH2
NaO3S


OH
N=N
SO3Na

Ю.Б.ФИЛИППОВИЧ
Т. А. ЕГОРОВА
Г. А. СЕВАСТЬЯНОВА

ПРАКТИКУМ ПО ОБЩЕЙ БИОХИМИИ

Под общей редакцией Ю. Б. Филипповича

Допущено Министерством просвещения СССР в качестве учебного пособия для студентов химических специальностей педагогических институтов

ИЗДАНИЕ 2-е, ПЕРЕРАБОТАННОЕ

МОСКВА
«ПРОСВЕЩЕНИЕ» 1982

ББК 28.072
Ф 53

Рецензент:
кандидат биологических наук,
доцент *Киреева З. В.*

Филиппович Ю. Б. и др.

Ф53 Практикум по общей биохимии: Учеб. пособие для студентов хим. спец. пед. ин-тов / Ю. Б. Филиппович, Т. А. Егорова, Г. А. Севастьянова; Под общ. ред. Ю. Б. Филипповича. — 2-е изд., перераб. — М.: Просвещение, 1982. — 311 с., ил.

Практикум соответствует программе по биохимии химико-биологических, химических и биолого-химических факультетов педагогических институтов.

Отобрано свыше 200 работ, охватывающих основные методы выделения, фракционирования, очистки, физические и химические способы качественного и количественного определения важнейших классов органических соединений, имеющих биологическое значение.

Для удобства пользования практикумом в начале каждой работы приводится список приборов, посуды, материалов и реактивов, необходимых для выполнения работы. Прописи приготовления специальных реагентов даны в большинстве случаев в приложении.

При составлении прописей было уделено значительное внимание доступности биологического материала для проведения опытов.

Ф $\frac{4309021400-477}{103(03)-82}$ 33—82

ББК 28.072
57.04

ПРЕДИСЛОВИЕ КО ВТОРОМУ ИЗДАНИЮ

Второе издание практикума, как и первое, соответствует программе по общей биохимии для химико-биологических, химических и биолого-химических факультетов и включает свыше 200 лабораторных работ разной степени сложности, иллюстрирующих современные методы выделения, фракционирования и очистки, способы качественного открытия и количественного определения, физические и химические свойства аминокислот, пептидов, белков, ферментов, витаминов, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов, гормонов и минеральных веществ.

Во втором издании сохранены и более сложные работы, предназначенные для студентов, проходящих спецпрактикум по биохимии, и студентов-дипломников, а также слушателей ФПК, выполняющих большой практикум по биохимии, сохранена и система ссылок на учебник по биохимии для педагогических институтов Ю. Б. Филипповича «Основы биохимии».

В данное издание практикума введены новые работы, а именно фракционирование белков методом изоэлектрофокусирования на пластинах полиакриламидного геля, количественное определение белка по методу Бредфорд, выделение нуклеиновых кислот из биологического материала хлороформным методом, а также несколько новых прописей по выделению и свойствам ферментов, включая работу по иммобилизации последних. Вместе с тем некоторые менее принципиальные, или, как показала практика работы, недостаточно воспроизводимые, опыты из второго издания исключены. Некоторые прописи видоизменены, уточнены и дополнены.

Как и при подготовке первого издания практикума, авторы использовали экспериментальные материалы, полученные сотрудниками и аспирантами кафедры (А. С. Коничевым, О. Д. Видута, В. Г. Ивановым, А. П. Эчкаловым, А. П. Бочковой, Е. В. Борзаковской, Е. А. Налетовой и др.), которым авторы выражают благодарность.

АМИНОКИСЛОТЫ И ПЕПТИДЫ

АМИНОКИСЛОТЫ

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И РАЗДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ

В настоящее время иасчитывают около 200 аминокислот, выделеииых из различных природных объектов. Кроме постоянно и иногда встречающихся в белках аминокислот (см. учебиик, с. 46—49)[1], в составе животиых, микроорганизмов и особеино растений обиаружены разнообразиые свободиые аминокислоты.

Способы выделеиия аминокислот зависят от того, находятся ли оии в свободном или связаином (в белках) состоянии. Свободные аминокислоты чаще всего извлекают из биологического материала 75—80%-ными водиыми растворами этаиола или метанола. Так как в случае растительных объектов возможеи переход в спиртовой экстракт иекоторых белков, последние дополнительио осаждают, либо измеияя pH среды, либо добавляя к ией те или иные осадители белков (с. 81—83). Хорошие результаты получают при экстракции свободиых амииокислот из биологических объектов 5%-ным водиым раствором трихлоруксусиой кислоты, которая является одним из лучших осадителей белков. Однако недостаток указанного метода состоит в том, что для дальиейшей работы с амииокислотами, содержащимися в такой вытяжке, необходимо удаление из нее трихлоруксусиой кислоты, представляющее довольио трудоемкую операцию. Для извлечения свободиых аминокислот из биологического материала примеияют многие другие вещества: воду, подкисленный ацетои, разбавленную уксусную кислоту и т. д.

Если амииокислота иаходится в связаниом состоянии, то выделить ее можио либо только после гидролиза белка, либо путем нагревания препарата с кислотами (20%-иый раствор HCl; 30%-иый раствор H_2SO_4) или осиоваииями (5 н. $NaOH$; 14%-иый раствор $Ba(OH)_2$), либо путем иикубации препарата с протеолитическими ферментами.

[1] Здесь и далее приводятся ссылки иа учебиик Ю. Б. Филипповича «Основы биохимии», Высшая школа, 1969.

Наиболее сложную и ответственную часть работы по выделению той или иной аминокислоты из природных объектов представляет процесс отделения данной аминокислоты от сопутствующих ей других аминокислот вытяжки или гидролизата. Ранее применявшиеся методы фракционирования аминокислот (разгонка в вакууме этиловых эфиров аминокислот, осаждение аминокислот в виде медных, серебряных и других солей, избирательное растворение некоторых аминокислот в органических растворителях) сейчас почти полностью заменены простым и эффективным хроматографическим методом разделения сложных аминокислотных смесей на индивидуальные составляющие.

ВЫДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Оборудование, реактивы. Воздушно-сухие куколки шелкопряда[1]; фильтры бумажные; ступка фарфоровая; баня водяная; термометр лабораторный; воронка стеклянная; чашка выпарительная; стеклянные палочки; пробирки химические; пипетки градуированные на 1 мл (2 шт.); этиловый спирт (75%-ный); соляная кислота (1%-ная), нингидрин (1%-ный) в ацетоне (95%-ном).

1 г размолотого сухого биологического материала помещают в ступку, заливают 10 мл 75%-ного раствора этилового спирта, подогретого до 60—70°С на водяной бане и растирают в течение 15 мин. Спиртовую вытяжку фильтруют через складчатый фильтр, используя чашку выпарительную в качестве приемника. Чашку помещают на кипящую водяную баню и выпаривают спирт досуха. Сухой остаток растворяют в 1 мл 1%-ного раствора соляной кислоты, тщательно соскабливая и растирая его стеклянной палочкой в течение 10—15 мин.

Аминокислоты в вытяжке обнаруживают реакцией с нингидрином (трикетогидринденом). Для этого в пробирке несколько капель вытяжки разводят водой до объема 2—3 мл и добавляют 3—4 капли 1%-ного раствора нингидрина в 95%-ном растворе ацетона. Перемешивают содержимое пробирки и ставят ее в нагретую до 70°С водяную баню на 5 мин. Появляется интенсивное сине-фиолетовое окрашивание, свидетельствующее о присутствии в испытуемой пробе α-аминокислот.

---

[1] Для работы используют высушенные насекомые, например куколки тутового шелкопряда, являющиеся отходами коконмотального производства и содержащие в несколько раз больше свободных аминокислот, чем другие объекты животного происхождения. При работе с иным материалом (ткани животных, фиксированные этанолом при нагревании и переведенные в сухой порошок) необходимо либо увеличить в 2—3 раза массу для экстракции свободных аминокислот, либо уменьшить в 2—3 раза объем 1%-ной HCl, идущей на растворение сухого остатка перед хроматографированием.

Сначала в результате взаимодействия аминокислоты с нингидрином возникает Шиффово основание. Затем оно претерпевает перегруппировку, декарбоксилируется и расщепляется на альдегид и аминодикетогидринден.

Перегруппировка

Шиффово основание

Декарбоксилирование

Расщепление

Дикетогидриндамин Альдегид

Аминодикетогидринден конденсируется еще с одной молекулой нингидрина, и образовавшееся соединение, енолизируясь, переходит в окрашенную форму, получившую название «Сине-фиолетовый Руэмана», по имени исследователя, впервые в 1910 г. изучившего эту реакцию:

Сине-фиолетовый Руэмана

В присутствии органических растворителей (ацетона, этанола, пиридина и др.), на которых обычно готовят раствор нингидрина, протекает побочная реакция:

Продукт этой реакции содержит в своем составе радикал (R) исходной аминокислоты, который обусловливает различиую окраску (голубую, красиую и т. п.) соединеиий, возникших при реакции амииокислот с нингидрином.

В иастоящее время иингидриновая реакция широко используется как для открытия отдельиых амииокислот, так и для определения их массы.

ВЫДЕЛЕНИЕ ТИРОЗИНА ИЗ ШЕЛКА

Оборудованне, реактнвы. Прнбор для вакуумной перегонки; микроскоп; баня водяная; сднр шелка; ножницы; колба круглодонная на 200 мл; обратный воздушный холоднльник (длина 70—80 см); термометр лабораторный; фнльтры бумажиые; воронкн стекляиные; чашка выпарнвательиая на 50 мл; склянка Бунзена с воронкой Бюхнера; воронка для горячего фнльтроваиия; соляная кислота (20%-ная); активнрованный уголь.

Сдир кокоиов тутового шелкопряда, представляющий отходы в производстве натурального шелка, очищают от остатков листьев и других механических примесей. Отвешивают 20 г сдира, измельчают его ножницами и помещают в круглодонную колбу на 200 мл, сиабжеииую обратным воздушиым холодильииком длиною 70—80 см. Бросают в колбу иесколько капилляров, приливают 100 мл 20%-иого раствора соляной кислоты, присоединяют обратиый холодильник и помещают колбу в кипящую водяную баню на 1—2 ч. Содержимое колбы перемешивают, следя за тем, чтобы твердые частички шелка не приставали к стенкам колбы, свободным от раствора кислоты. Как только шелк растворится, колбу снимают с водяной бани, вытирают полотенцем и помещают на асбестовую сетку, где при слабом кипении раствора в течение 16 ч (можно с перерывом) ведут дальнейший гидролиз белка (рис. 1). Гидролизат охлаждают и, если заметен черный осадок нерастворимых в кислоте гуминов, фильтруют, прииимая фильтрат в круглодониую колбу на 200 мл, промывая фильтр дважды небольшими порциями воды. Колбу присоединяют к устаиовке для вакуум-перегонки соляной кислоты (рис. 2). Перегонку ведут досуха при температуре водяной бани от 45 до 50°С, повторяя ее многократно до полного удаления соляной кислоты. С этой целью по окончаиии первой перегоики добавляют в перегонную колбу 20—30 мл дистиллированной воды и перегонку повторяют. Эту процедуру проводят обычно 5—6 раз. Завершив последиюю перегонку, прибавляют 10 мл горячей дистиллированной воды и растворяют сухой остаток в течение 10—15 мин при иагревании на водяной бане. Раствор фильтруют в выпаривательную чашку на 50 мл. Обработку осадка горячей водой и фильтрование повторяют еще два раза. Объедииенные фильтраты обесцвечивают трехкратиым кипячением с активированным углем, каждый раз отделяя уголь иа вороике для горячего фильтрования. Полученный раст-

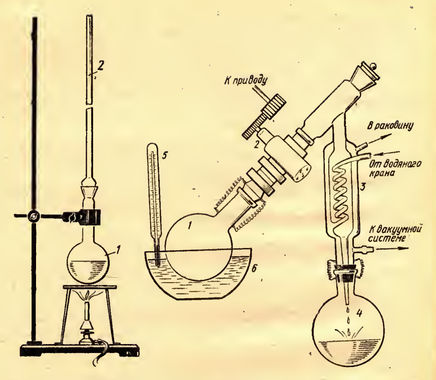


Рис. 1. Установка для гидролиза:

1 — колба; *2* — воздушный холодильник.

Рис. 2. Установка для вакуумной отгонки (роторный испаритель):

1 — колба для отгонки; *2* — узел для вращения перегонной колбы; *3* — холодильник; *4* — приемник; *5* — термометр; *6* — водяная баня.

вор упаривают на водяной бане до появления пленки из кристаллов. Как только это произойдет, раствор охлаждают и выпавшие кристаллы тирозина отсасывают на воронке Бюхнера. Фильтрат вновь упаривают до появления пленки, охлаждают и отсасывают осадок через тот же фильтр.

Если кристаллы тирозина получились темного цвета, их растворяют в минимальном объеме горячей воды, прибавляют немного активированного угля, кипятят 10 мин. Уголь отфильтровывают на воронке для горячего фильтрования. Фильтрат упаривают до появления на поверхности пленки кристаллов и охлаждают. Кристаллы тирозина отсасывают и высушивают между листами фильтровальной бумаги.

Небольшую порцию шелковистых кристаллов рассматривают под микроскопом. Они имеют игольчатую форму и часто собраны в сноповидные друзы. Форму кристаллов зарисовывают в тетрадь.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ АМИНОКИСЛОТ

Разделение смеси аминокислот на индивидуальные составляющие методом хроматографии распределения на бумаге

Оборудование, реактивы. Камера для проявления хроматограмм; шкаф сушильный; перчатки резиновые; бумага хроматографическая; карандаш простой; линейка; пластинки стеклянные (длина 35—40 см и ширина 5—8 см; 4 шт.); микропипетки калиброванные (4 шт.); лодочка хроматографическая; цилиндры мерные на 50 и 100 мл; палочки стеклянные (50—60 см); держалки стеклянные для сушки хроматограмм; стандартная смесь аминокислот; бутанол; ледяная уксусная кислота; нингидрин (1%-ный) в ацетоне (95%-ном); нитрат меди (насыщ.) в ацетоне (90%-ном).

Берут лист хроматографической бумаги (32×58 см) и на расстоянии 8 см от узкого края проводят карандашом прямую линию, которую делят на десять отрезков (два крайних по 4 см, остальные — по 3 см). Каждое пересечение нумеруют. Под размеченный край бумаги подкладывают две стеклянные пластинки (4×40 см) так, чтобы линия со штрихами оказалась точно над серединой сантиметрового промежутка между стеклами. Сверху на бумагу кладут еще две такие же стеклянные пластинки параллельно нижним стеклам. В результате линия нанесения аминокислотной смеси фиксируется над поверхностью стола (рис. 3).

В точку пересечения *5* специальной калиброванной микропипеткой, изготовленной из капиллярной трубки с оттянутым концом, наносят 0,05 мл стандартной смеси аминокислот (см. приложение). Нанесение проводят в несколько приемов, следя за тем, чтобы пятно раствора при каждом прикосновении пипетки к бумаге не растекалось более чем на 3 мм. Каждую последующую порцию раствора из пипетки наносят после полного высыхания предыдущей, что определяют по исчезновению просвечивания бумаги в точке нанесения. Точно таким же образом наносят на бумагу вытяжку аминокислот, причем каждому работающему отводится одна точка для полученной им вытяжки. Таким образом на одном листе бумаги можно проанализировать одновременно восемь экстрактов.

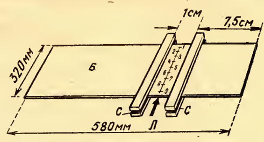


Рис. 3. Схема разметки и расположения хроматографической бумаги:

Б — хроматографическая бумага; С — стеклянные пластинки; Л — линия нанесения аминокислот.

Подготовленную так хроматограмму проявляют смесью бутанола, уксусной кислоты и воды (15 : 3 : 7) в специальной герметически

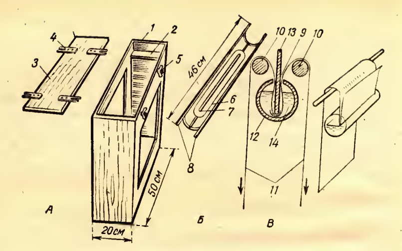


Рис. 4. Аппаратура для проявления хроматограмм:

А — хроматографическая камера: *1* — резиновый уплотнительный валик; *2* — выступы для установки лодочки; *3* — крышка; *4* и *5* — проушины и винтовой зажим с барашком для крепления крышки; Б — лодочка для нисходящей хроматографии: *6* — лодочка; *7* — щель; *8* — несущие палочки; В — схема закрепления хроматограммы в лодочке (разрез): *9* — щель; *10* — несущие палочки; *11* — хроматограммы; *12* — корпус лодочки; *13* — стеклянная пластинка, удерживающая хроматограммы; *14* — проявитель (стрелки указывают направление движения проявителя); Г — лодочка с закрепленной в ней хроматограммой.

закрывающейся камере (рис. 4). В простейшем случае камера представляет собой деревянный ящик размером $20 \times 50 \times 60$ см с двумя боковыми стеклами и съемной крышкой. Изнутри деревянные части камеры и стыки покрываются парафином для обеспечения полной непроницаемости для паров проявителя. В нижней части камеры помещают ванночки, заполненные наполовину проявителем для насыщения его парами воздуха внутри камеры. В верхней части камеры на двух выступах торцовых стенок устанавливают лодочку для проявителя, в которой при помощи стеклянной пластинки закрепляют верхний конец хроматограммы. В лодочку через воронку с оттянутым кончиком, свободно входящим в щель, наливают 50 мл проявителя. Его готовят, смешивая 30 мл бутанола, 6 мл ледяной уксусной кислоты и 14 мл воды. Полученную смесь сильно встряхивают, чтобы образовался однофазный раствор. Камеру закрывают крышкой, плотно затягивают зажимы и оставляют на необходимое время для проявления.

Все операции с хроматографической бумагой и хроматограммами проделывают тщательно вымытыми руками, а еще лучше — в хорошо отмытых тонких резиновых перчатках. Вся аппаратура (лодочки, несущие палочки, стекла для фиксации хроматограммы над поверхностью стола и в лодочке и т. п.) должна быть очень чистой. В противном случае после прове-

дения реакции по обнаружению аминокислот на хроматограмме выступает много пятен, не относящихся к аминокислотам изучаемого экстракта.

Проявление ведут в течение 20—40 ч в зависимости от сорта хроматографической бумаги (быстро- или медленновпитывающей). Точное время хроматографирования устанавливают экспериментально, следя за движением фронта проявителя через стеклянные стенки камеры. По достижении фронтом проявителя нижнего свободно висящего конца хроматограммы отмечают прошедшее время и оставляют хроматограмму в камере еще на $^1/_3$ этого времени.

Удалив из лодочки стеклянную пластинку, проявленную хроматограмму снимают, просовывая стеклянную палочку вдоль наружной стенки лодочки и извлекая ею хроматограмму сначала из лодочки, а затем из камеры. Верхний конец хроматограммы немедленно вставляют в держалку, сделанную из трех скрепленных резиновым кольцом стеклянных палочек, и помещают на 20 мин в вытяжной шкаф для удаления из бумаги проявителя.

Высушенную хроматограмму протаскивают через 1%-ный раствор нингидрина в 95%-ном ацетоне для обнаружения на ней позиций аминокислот. Раствор нингидрина помещают в широкую плоскую ванночку, установленную наклонно. Хроматограмму ведут через раствор от верхнего конца к нижнему непрерывным плавным движением (рис. 5), взяв в правую руку держалку из стеклянных палочек, а левой рукой поддерживая нижний конец хроматограммы.

Затем хроматограмму помещают на 10 мин в вытяжной шкаф для удаления ацетона и переносят в сушильный шкаф, где оставляют ее на 15 мин при 70°С. Более надежным, но длительным является метод обнаружения аминокислот на хроматограмме путем экспозиции ее в герметически закрытой камере с 40%-ной относительной влажностью при комнатной температуре в течение нескольких часов (как правило, в течение ночи). Аминокислоты стандартной и исследуемой смеси обнаруживаются в виде сине-фиолетовых пятен, расположенных цепочкой по направлению движения проявителя от линии старта к нижнему краю хроматограммы. Уравнение реакции между нингидрином и аминокислотой в точке локализации последней на бумаге приведено выше (с. 6). В отличие от других аминокислот пролин образует с нингидрином соединение желтого цвета (с. 25). Некоторые из свободных

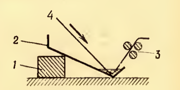


Рис. 5. Установка для протаскивания хроматограммы через раствор нингидрина для обнаружения аминокислот:

1 — подставка; *2* — ванночка; *3* — держалка из стеклянных палочек, в которой закреплен верх хроматограммы (разрез); *4* — хроматограмма (стрелка указывает направление движения бумаги).

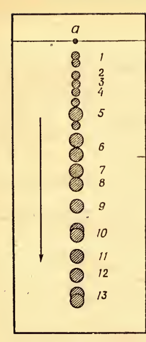


Рис. 6. Схема расположения аминокислот на хроматограмме, проявленной смесью бутанола, уксусной кислоты и воды (15 : 3 : 7):

а — точка нанесения смеси аминокислот; *1* — цистин и цистеин; 2 — лизин; *3* — гистидин; *4* — аргинин; *5* — аспарагиновая кислота, серин и глицин; *6* — глутаминовая кислота и треонин; *7* — аланин; *8* — пролин; *9* — тирозин; *10* — валин и метионин; *11* — триптофан; *12* — фенилаланин; *13* — лейцин и изолейцин.

аминокислот (оксипролин, пипеколиновая кислота и др.) также дают с нингидрином различно окрашенные соединения.

Идентификацию аминокислот проводят по совпадению на хроматограмме позиций аминокислот испытуемой смеси с аминокислотами стандарта. Расположение аминокислот в используемом проявителе — смеси бутанола, уксусной кислоты и воды (15 : 3 : 7) — хорошо изучено (рис. 6). Пользуясь указанной схемой, легко установить, какие аминокислоты присутствуют в исследуемом экстракте, и даже приблизительно определить содержание той или иной аминокислоты или группы аминокислот. Данные по расшифровке хроматограммы в виде схемы расположения аминокислот в стандартной и испытуемой смеси заносят в рабочий журнал.

Сине-фиолетовый Руэмана на хроматограмме довольно быстро (в течение нескольких дней) разрушается. Чтобы избежать обесцвечивания пятен на хроматограмме, ее протаскивают через насыщенный раствор нитрата меди в 90%-ном растворе ацетона. При этом сине-фиолетовый Руэмана превращается в комплексную медную соль красного цвета (см. ниже).

В таком виде хроматограмма может храниться несколько месяцев.

2 [сине-фиолетовый Руэмана] $+ Cu^{2+} \longrightarrow$ [медная соль]

Сине-фиолетовый Руэмана

Медная соль сине-фиолетового Руэмана (красного цвета)

Упрощенный способ качественного анализа аминокислотных смесей методом хроматографии распределения на бумаге

Оборудоваине и реактнвы. Шкаф сушнльный; пульвернзатор; пнпетки из капнлляриых трубок; хроматографнческне сосуды стеклянные (цилиндры) с крышкамн стеклянными притертыми; пластинки стекляииые (3 × 20 см); хнмическне стаканы с носнком; палочкн стекляниые, скрепленные по 3 шт. каучуковыми кольцами; бумага хроматографическая, быстро впитывающая; лнзнн, аланин н феннлаланин (0,1 *М*) в нзопропиловом спнрте (10%-ном), подкнсленном соляиой кнслотой; нингндрин (0,5%-ный) в ацетоие (95%-ном).

Проводят простым карандашом линию на расстоянии 3 см от короткого края листа хроматографической бумаги (10×20 см). Делят прямую линию на отрезки по 2 см и деления обозначают цифрами 1, 2, 3 и 4. Помещают этот край бумаги на две стеклянные пластинки, расположенные параллельно друг другу с зазором 1 см, следя за тем, чтобы разметка бумаги оказалась над зазором. Бумагу прижимают к нижним пластинкам двумя такими же верхними пластинками (рис. 3).

Заполняют три капиллярные пипетки растворами аминокислот на расстоянии около 1 см от оттянутого конца. В первую пипетку набирают раствор лизина, во вторую — аланина и в третью — фенилаланина. Прикасаясь кончиком первой пипетки к бумаге в точке *1*, выпускают половину раствора лизина, а оставшуюся часть раствора лизина наносят в точку *4*. Через несколько минут, когда пятно в позиции *4* подсохнет, наносят на хроматограмму раствор аланина (в точках *2* и *4*), а затем — раствор фенилаланина (в точках *3* и *4*). В результате в точке *4* будет нанесена смесь трех аминокислот — лизина, аланина и фенилаланина, а в точках *1*, *2* и *3* — отдельно каждая из них.

Для проявления хроматограмму помещают в хроматографический сосуд, на дно которого налита смесь бутанола, уксусной кислоты и воды (15 : 3 : 7). Хроматограмму подвешивают так, чтобы короткий край ее со стороны линии нанесения аминокислот был погружен в проявитель на 1—2 см. Сосуд плотно закрывают крышкой и оставляют в нем хроматограммы на 2 ч. За это время проявитель пройдет по хроматограмме путь снизу вверх, равный примерно 10 см (восходящая хроматограмма).

Хроматограмму вынимают из сосуда, отмечают границу фронта проявителя, делая небольшие надрезы ножницами слева и справа, и высушивают под тягой. На высушенную хроматограмму наносят при помощи пульверизатора 0,5%-ный раствор нингидрина в ацетоне так, чтобы вся хроматограмма была равномерно (без подтеков) смочена раствором.

Как только ацетон испарится, хроматограмму помещают в сушильный шкаф при температуре 70°C на 15 мин. Позиции аминокислот на хроматограмме выявляются в виде сине-фиолетовых пятен.

Чтобы определить, какая из аминокислот смеси (точка *4*) является лизином, аланином или фенилаланином, сравнивают позиции аминокислот-свидетелей с позициями аминокислот в разделяемой смеси. Аминокислоты, располагающиеся на одном уровне, идентичны.

Идентификацию аминокислот можно осуществить по значению R_f (коэффициент подвижности по фронту проявителя). Для этого измеряют с точностью до миллиметра расстояние, пройденное проявителем от линии нанесения аминокислот до границы фронта проявителя. С такой же точностью измеряют расстояние от точки нанесения каждой аминокислоты на хроматограмму до центра цветного пятна, образовавшегося в результате нингидриновой реакции. Путем деления величины пути, пройденного аминокислотой на хроматограмме, на величину пути, пройденного проявителем, находят значение коэффициента подвижности (R_f) каждой аминокислоты-свидетеля. Такие же расчеты проводят с аминокислотами исследуемой смеси. Сопоставляя величины R_f аминокислот-свидетелей и аминокислот исследуемой смеси, делают заключение о природе аминокислот в составе изучаемой смеси. Как правило, величины R_f аминокислот-свидетелей берут из справочной литературы и по этим значениям осуществляют идентификацию аминокислот неизвестной смеси.

Разделение смеси аминокислот методом хроматографии распределения в тонком слое целлюлозы

В последнее время для разделения аминокислот, пептидов и их производных все шире используют метод хроматографии в тонком слое (ХТС) пористого носителя (порошкообразного силикагеля или целлюлозы), нанесенного на стеклянную или пластиковую пластинку. Этот метод по сравнению с хроматографическим методом разделения аминокислот на бумаге требует значительно меньше времени и позволяет почти в десять раз уменьшить концентрацию веществ, подвергающихся исследованию.

Аминокислоты при работе методом тонкослойной хроматографии на пластинках с силикагелем или целлюлозным порошком идентифицируют, сравнивая положение анализируемых аминокислот с положением аминокислот стандартной смеси. Облегчает идентификацию аминокислот внесение свидетеля прямо в анализируемую смесь, например ε-ДНФ-лизина, по отношению к которому можно вычислить величину $R_{ст.}$ (коэффициент подвижности по внутреннему стандарту) для каждой аминокислоты:

$$R_{ст.} = \frac{\text{Расстояние анализируемого вещества от старта}}{\text{Расстояние пятна стандарта от старта}}$$

Получаемые при этом значения $R_{ст.}$ являются более воспроизводимыми, чем величины R_f. Хорошие результаты дает использование двухмерной хроматографии, когда разделение стандартной смеси аминокислот и исследуемой смеси проводят в идентичных условиях. Можно также сочетать электрофорез в тонком слое с хроматографическим разделением (хроматоэлектрофорез), еще более результативным, чем ХТС в чистом виде.

Оборудование, реактивы. Мельница шаровая; шкаф сушильный (100°С); камера для тонкослойной хроматографии с притертой крышкой (15 × 20 × × 25 см); пластинки стеклянные (13 × 18 или 9 × 12; фотопластинки, отмытые от эмульсии); пипетки для нанесения растворов на хроматограмму, изготовленные из капиллярных трубок, с тщательно отшлифованными концами; бумага хроматографическая медленно впитывающая; очищенная перегонкой ледяная уксусная кислота; азотная кислота (5%-ная); метанол; изопропиловый спирт; соляная кислота (1 н.); стандартные смеси аминокислот типа А и типа Б или полная стандартная смесь аминокислот. Для приготовления стандартной смеси аминокислот типа А смешивают по 0,05 мл (т. е. по одной капле) орнитин (0,1М), оксипролин (0,1 М), глутаминовую кислоту, серин, аланин, фенилаланин, лейцин и ε-ДНФ-лизин, приготовленные на смеси муравьиной и уксусной кислот с водой (7 : 5 : 3). Для приготовления смеси типа Б смешивают гистидин, аспарагиновую кислоту, пролин, треонин, тирозин, валин, глицин и ε-ДНФ-лизин в тех же объемах той же концентрации и в той же системе растворителей, что и смесь типа А. Полную стандартную смесь аминокислот готовят из равных объемов 0, 1М растворов всех белковых аминокислот в изопропиловом спирте (10%-ном), подкисленном соляной кислотой; *н*-бутанол; *трет*-амиловый спирт, метилэтилкетон; нингидрин (в порошке).

Приготовление целлюлозного порошка. 10 листов хроматографической бумаги разрезают на куски и заливают 3 л 5%-ного раствора азотной кислоты. Смесь нагревают до кипения и кипятят 50—60 мин при помешивании. После охлаждения бумажную массу промывают дистиллированной водой до pH 6—7, высушивают при 80—100°С и измельчают на шаровой мельнице. Полученный порошок просеивают через сито с отверстиями размером 0,25 мм. Для удаления примесей, дающих реакцию с нингидрином, 50 г целлюлозного порошка суспендируют в 200 мл 80%-ного метанола, переносят на воронку Бюхнера и промывают растворителями или их смесями в следующей последовательности: 1) изопропанол — вода — уксусная кислота (3 : 1 : 1) — 300 мл; 2) метанол — вода (1 : 3) — 200 мл; 3) этанол — 1 н. соляная кислота (3 : 2) — 200 мл; 4) вода — 200 мл; 5) метанол — 200 мл. Затем порошок высушивают в вакууме в течение ночи, снова измельчают и используют для нанесения на стекло в виде тонкого слоя без добавок.

Нанесение на стеклянные пластинки тонкого слоя целлюлозы. Стеклянные пластинки тщательно моют, используя детергенты, воду и этиловый спирт. На 7 пла-

стинок (13× 18 см) требуется 22 г целлюлозы в 100 мл воды. Смесь встряхивают в закрытой склянке в течение 1 мин и наносят по 14 мл этой смеси на пластинку. Пластинки с нанесенным слоем целлюлозы оставляют на ночь при комнатной температуре и затем хранят в закрытом сосуде.

Можно наносить более тонкий слой целлюлозы, особенно, если используется целлюлоза марки NM 300. В этом случае на пластинку (13× 18 см) можно нанести 0,5—1 г целлюлозного порошка в 8—9 мл воды.

Качественное определение аминокислот. Исследуемые и стандартные растворы аминокислот наносят на стартовую линию, осторожно проведенную простым мягким карандашом на расстоянии 1,5—2 см от короткого края пластинки. Между точками нанесения сохраняют расстояние не менее 0,8 см, отмечая их также мягким простым карандашом. Растворы наносят специальными капиллярными пипетками с хорошо отшлифованными концами, стараясь не повредить слой целлюлозы и не допуская расплывания нанесенного раствора до пятна диаметром более 0,2 см. Для обеспечения ровного фронта проявителя на пластинке с верхнего и боковых краев ее снимают слой целлюлозы шириной 0,5 см. Хроматограмму помещают в камеру, насыщенную парами проявителя (стенки камеры заранее покрывают изнутри хроматографической бумагой и пропитывают ее проявителем), на 50—60 мин, погружая нижний край пластинки (со стороны линии нанесения) в проявитель на 0,5—0,8 см. По истечении указанного времени пластинку вынимают и сушат. Фронт проявителя должен быть на расстоянии около 10 см от линии старта.

Рис. 7. Схема расположения аминокислот на тонкослойной хроматограмме, проявленной смесью бутанола, уксусной кислоты и воды (4:1:1):

А — точка нанесения смеси аминокислот типа А; Б — точка нанесения смеси аминокислот типа Б; *лиз, сер, опр, глу, ала, ε-ДНФ-лиз, фен, лей, гис, асп, гли, тре, про, тир, вал*-позиции аминокислот на тонкослойной хроматограмме.

В качестве проявителей используют смеси: 1) *н*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 1); 2) *трет*-амиловый спирт — метилэтилкетон — вода (2 : 2 : 1); 3) пиридин — *н*-бутанол — уксусная кислота — вода (94 : 19 : 63 : 75). В состав перечисленных проявителей вводят нингидрин из расчета 50 мг на каждые 100 мл. В этом случае аминокислоты обнаруживаются сразу после высыхания пластинки, а цветные пятна получаются более четкими по сравнению с теми, что выявляются при обнаружении аминокислот путем опрыскивания пластинок раствором нингидрина.

Полученные таким путем карты фотографируют или переснимают на кальку. Идентификацию аминокнслот осуществляют либо по совпадению позиции аминокислот исследуемой и стандартной смеси, либо по значениям $R_{ст}$ или R_f аминокислот исследуемой смесн. Типичное расположение аминокислот-свидетелей н ε-ДНФ-лизина на тонкослойной хроматограмме, проявленной в системе бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 1), приведено на рисунке 7.

Разделение аргинина и тирозина методом колоночной хроматографии

Нанболее эффектнвное разделение этих двух аминокислот достигается прн использованни слабокислых карбоксильных полиакриловых катнонитов, например амберлита IRC-50 или экспериментального катионита КБ-1. При проявлении хроматограммы цитратнофосфатным буферным раствором (pH 6,0) вытесненне (ионный обмен) катионов тирозина и аргинина со смолы ионами натрия буферной смеси идет с резко различной скоростью. Это объясняется различием суммарного положительного заряда молекул разделяемых аминокислот: у тирозина при pH 6 заряд близок к нулю, а у аргинина его величина вполне ощутима, вследствие присутствия двух положительно заряженных групп.

В результате сначала выносится с током проявителя из колонки тирозин, а затем аргинин. Между ними выходит чистый проявитель, не содержащий ни той, ни другой аминокислоты.

Оборудование, реактивы. Фотоэлектроколориметр; штативы лабораторные с набором лапок; штативы деревяиные иа 48 пробирок каждый (3 шт.); зажим виитовой; баия водяиая; баия ледяиая; пробирки с метками иа 5 мл; бюретка иа 10 мл; бюретка иа 50 мл с краиом; бюретка иа 50 мл без краиа или стекляииая трубка длиной 70 см и диаметром 1 см с оттянутым коицом; пипетка на 1 мл; стекляииая трубка длиной 5 см и диаметром 0,5—0,7 см с тоико оттяиутым коичиком; стекляииый гвоздь; каучуковая трубка диаметром 0,5—0,7 см; стекляииая вата; амберлит IRC-50 или аиалогичиый ему карбоксильиый катиоиит; ацетои; гидроксид иатрия (0,1 и.); соляиая кислота (0,1 и.); фосфатиолимоинокислый буфер, pH 6,0 (готовится смешеинем 0,2 M Na_2HPO_4 и 0,1 M лимоииой кислоты в отиошеиии 12,63 : 7,37); реактив Фолииа (см. приложеиие); карбоиат иатрия (4%-иый); сульфат меди (2%-иый); тартрат калия и иатрия (4%-ный); 8-оксихииолии (0,2%-иый) в этаноле (96%-иом); гидроксид иатрия (10%-иый); мочевииа (40%-иая); гипобромит иатрия (см. приложеиие); соляиокислые аргиини и тирозии в фосфатиолимоииокислом буфере (0,02%-иые) (при раствореиии тирозииа рекомеидуется подогреваиие).

Собирают прибор в соответствии с рнсунком 8. Катионит (амберлит IRC-50) промывают путем декантацин водой ацетоном, 1 н. раствором гидроксида натрия, снова водой, 1 н. раствором соляной кислоты, опять водой и несколько раз фосфатно-

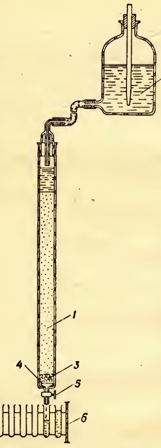


Рис. 8. Прибор для разделения тирозина и аргинина методом колоночной хроматографии:

1 — хроматографическая колонка; *2* — склянка с проявителем; *3* — стеклянная вата; *4* — стеклянный гвоздь; *5* — кран; *6* — штатив с пробирками.

лимоннокислым буфером. При повторном использовании смолы промывка ацетоном может быть опущена. Взвесь ионообменной смолы в фосфатнолимоннокислом буфере (1 : 1) заливают в колонку, нижнюю часть которой вместе со сливным наконечником предварительно заполняют буфером так, чтобы в них не содержалось пузырьков воздуха. Открыв винтовой зажим, устанавливают медленный отток из колонки буферного раствора, вводя время от времени взвесь катионита в буфере. Скорость оттока буфера должна быть соизмерима со скоростью оседания частиц смолы. Добавление взвеси прекращают, когда слой осевшего катионита достигнет отметки 40 см, после чего промывают колонку чистым буферным раствором. В это время смешивают по 0,6 мл 0,02 %-ных растворов тирозина и аргинина и 1 мл этой смеси пипеткой вносят подслаиванием в колонку, когда над поверхностью катионита останется слой буфера в 1 см. Как только внесенная смесь аминокислот и покрывающий ее буферный раствор впитываются в смолу, осторожно (не допуская взмучивания смолы и повреждения ровной поверхности ее в колонке) доливают буфер в колонку, подключают к ней склянку с проявителем и устанавливают скорость оттока жидкости из колонки 8—10 капель в 1 мин. Подставляют под колонку штатив с пробирками, имеющими метки на 5 мл, и продвигают его каждый раз на одну пробирку, когда в предыдущую набралось 5 мл элюата. При наличии в лаборатории коллектора фракций (рис. 9) пробы заданного объема отбирают при помощи сифона или реле времени. В случае разделения полной аминокислотной смеси получают выходную кривую, показанную на рисунке 10.

В каждой порции элюата определяют наличие или отсутствие тирозина и аргинина. Реакции на указанные аминокислоты осуществляют следующим образом.

Определение тирозина. Готовят щелочный раствор, смешивая 1 мл 2%-ного раствора сульфата меди с 1 мл 4%-ного раствора тартрата калия и натрия и 100 мл 4%-ного раствора карбоната натрия. К 5 мл щелочного раствора приливают 1,0 мл элюата и нагревают на водяной бане при 40°С в течение 15 мин. Добавляют 0,5 мл реактива Фолина, хорошо перемешивают и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Экстинкцию раствора измеряют на фотоэлектроколориметре при 660 нм против контроля в кювете с рабочей длиной 10 мм.

Определение аргинина. К 1 мл элюата добавляют 2 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и 2 мл 0,02%-ного раствора 8-оксихинолина (0,2%-ный разводят в 10 раз этанолом). Пробирку охлаждают в ледяной бане в течение 10 мин. Приливают из бюретки на 10 мл 6—8 капель раствора гипобромита натрия и немедленно энергично встряхивают содержимое пробирки в течение 25 с. Сразу после этого из бюретки на 50 мл приливают 2 мл 40%-ного раствора мочевины и встряхивают в течение 5 мин. Экстинкцию раствора измеряют на фотоэлект-

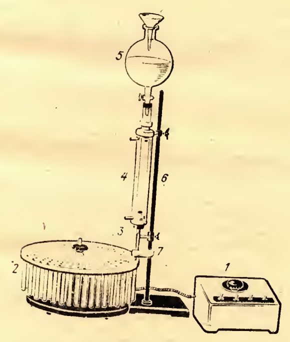


Рис. 9. Установка для колоночной хроматографии с коллектором фракций:

1 — панель управления; *2* — вращающийся диск с пробирками; *3* — пробоотборная трубка; *4* — колонка; *5* — сосуд с проявителем; *6* — штатив; *7* — фотометрический датчик.

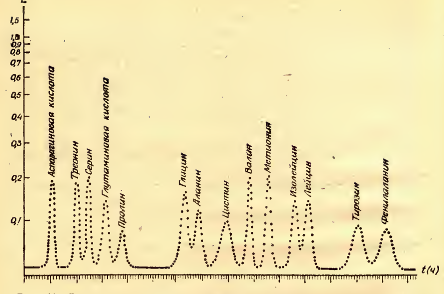


Рис. 10. Выходная кривая при разделении аминокислотной смеси в автоматическом анализаторе аминокислот:

E — плотность окраски после проведения цветной реакции на аминокислоту с нингидрином; *t* — время проведения опыта; колонка (0,9 × 48 см со смолой № 3105 фирмы «Хитачи»; температура колонки — 55 °С; элюент — 0,2 н. цитратный буфер с pH=3,25; скорость элюции — 120 мл/ч.

роколориметре при 500 нм против воды в кювете с рабочей длиной 10 мм.

По полученным значениям экстинкций строят кривые выхода тирозина и аргинина из колонки. По оси абсцисс откладывают значения фотометрических плотностей, а по оси ординат — номера проб. Работу заканчивают, когда экстинкции растворов, где проводили реакцию на аргинин, резко снижаются, приближаясь к нулю. Работа по разделению тирозина и аргинина методом колоночной хроматографии может быть дополнена определением масс аминокислот, вышедших из колонки в каждой пробе. Для этого необходимо построить калибровочные кривые для каждой из аминокислот по стандартным их растворам, содержащим от 5 до 100 мкг аминокислоты, в соответствии с приведенным выше их определением. Тогда по оси абсцисс целесообразно откладывать массу найденной аминокислоты в микрограммах. Суммируя значения, найденные во всех пробах, проверяют полноту ее снятия с ионообменной смолы (в процентах к исходному количеству, внесенному в колонку).

Вместе с тем возможно упрощение опыта по разделению тирозина и аргинина. В частности, может быть снято фотометри-

рование растворов после проведения цветных реакций для построения выходных кривых. В этом случае ограничиваются качественной оценкой результатов, помещая пробирки с цветными тестами на тирозин и аргинин двумя рядами в один штатив так, чтобы пробы с одинаковыми номерами оказались друг против друга. Визуальные наблюдения покажут, что прежде всего в пробах обнаруживается тирозин, причем интенсивность окраски проб на него сначала возрастает, а затем падает. В одноименных пробах цветные реакции на аргинин отрицательны. Затем следует несколько проб, где отрицательны цветные реакции и на ту, и на другую аминокислоту. После этого в пробах обнаруживается присутствие аргинина.

По окончании работы катионит извлекают из колонки, промывают дважды водой, заливают 10%-ным раствором щелочи и сдают лаборанту.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА АМИНОКИСЛОТЫ

Радикалы аминокислот (см. учебник, с. 45—51) исключительно разнообразны. Это дает возможность для обнаружения большинства аминокислот использовать цветные реакции. Многие из них весьма чувствительны и высокоспецифичны, что позволяет открывать ничтожные количества той или иной индивидуальной аминокислоты в составе сложных смесей, биологических жидкостях, гидролизатах белков и т. п. Некоторые цветные реакции находят применение для количественного определения аминокислот.

Оборудование, реактивы. Баня водяная; термометр лабораторный; ванночка со льдом; держалки для пробирок; цилиндры мерные на 10 мл; пипетки мерные на 1 и 5 мл; пробирки стеклянные химические; тирозин (порошок); серная кислота (2,5%-ная); реактив Миллона (см. приложение); аргинин (0,01%-ный); гидроксид натрия (10%-ный); α-нафтол (0,2%-ный) в спирте; гипобромит (см. приложение); мочевина (40%-ная); сульфаниловая кислота (1%-ная) в соляной кислоте (5%-ной); нитрит калия (0,5%-ный); гистидин (0,01 %-ный); карбонат натрия (10%-ный); триптофан (0,005%-ный); глиоксиловая кислота (см. приложение); сульфат меди (0,04 М); серная кислота (конц.); пролин (0,01%-ный); нингидрин (1%-ный) в ацетоне (95%-ном); пролин (0,01%-ный) в ледяной уксусной кислоте; изатин (0,03%-ный) в ледяной уксусной кислоте; глицин (0,01%-ный); свежеперегнанный водный раствор *о*-фталевого диальдегида (2 г *о*-фталевого диальдегида растворяют в 300 мл дистиллированной воды и водный раствор перегоняют); метионин (0,02%-ный); нитропруссид натрия (10%-ный); гидроксид натрия (14,3 н.); смесь соляной ($\rho = 1/19$ г/см^3) и фосфорной (85%-ной) кислот 9 : 1.

1. Цветная реакция на тирозин (реакция Миллона). В пробирке к нескольким кристаллам тирозина (коммерческого или полученного из шелка) прибавляют 5 мл 2,5%-ного раствора серной кислоты и перемешивают до полного растворения. Приливают 1 мл реактива Миллона, встряхивают и

оставляют стоять при комнатной температуре. Через некоторое время раствор окрашивается в кроваво-красный цвет. Для ускорения появления окраски раствор можно слегка подогреть.

Реактив Миллона представляет собой смесь нитратов и нитритов оксида ртути (I) и (II), растворенных в концентрированной азотной кислоте. При взаимодействии его с фенольным ядром тирозина возникает нитрозотирозин, ртутное соединение которого окрашено в красный цвет:

$$HO{-}C_6H_4{-}CH_2{-}CH(NH_2){-}COOH + HgNO_2 \xrightarrow{Hg^{+2};\,HNO_3} HgO{-}C_6H_3(NO){-}CH_2{-}CH(NH_2){-}COOH + H_2O$$

Тирозин — *Ртутное соединение нитрозотирозина*

2. Цветная реакция на аргинин (реакция Сакагучи). В пробирку наливают 2 мл 0,01%-ного раствора аргинина, прибавляют 2 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и несколько капель 0,2%-ного спиртового раствора α-нафтола. Хорошо перемешивают содержимое пробирки, приливают 0,5 мл раствора гипобромита и вновь перемешивают. Немедленно добавляют 1 мл 40%-ного раствора мочевины для стабилизации быстро развивающегося оранжево-красного окрашивания.

Хотя механизм реакции аргинина с α-нафтолом в присутствии окислителя еще полностью не выяснен, некоторые наблюдения свидетельствуют в пользу следующей схемы. Сначала α-нафтол в присутствии окислителя соединяется с гуанидиновой группировкой аргинина:

$$C_{10}H_7OH + NaBrO + H_2N{-}C({=}NH){-}NH{-}(CH_2)_3{-}CH(NH_2){-}COOH \longrightarrow$$

α-Нафтол — *Аргинин*

$$\longrightarrow HO{-}C_{10}H_6{-}NH{-}C({=}NH){-}NH{-}(CH_2)_3{-}CH(NH_2){-}COOH + H_2O + NaBr$$

Нафтиларгинин

Затем при дальнейшем окислении нафтиларгинина образуется соединение типа хинонимина:

$$HO-C_{10}H_6-NH-\underset{}{\overset{NH}{\overset{\|}{C}}}-NH-(CH_2)_3-\overset{NH_2}{\overset{|}{CH}}-COOH + NaBrO \longrightarrow$$

$$\longrightarrow O=C_{10}H_6=N-\overset{NH}{\overset{\|}{C}}-NH-(CH_2)_3-\overset{NH_2}{\overset{|}{CH}}-COOH + NaBr + H_2O$$

Так как производные хинониминов (в данном случае нафтохинонимина), у которых водород иминогруппы замещен на алкильный или арильный радикал, всегда окрашены в желто-красные тона, то, по-видимому, оранжево-красный цвет раствора при проведении реакции Сакагучи объясняется возникновением именно производного нафтохиноимина. Не исключена, однако, вероятность образования еще более сложного соединения за счет дальнейшего окисления оставшихся NH-групп гуанидинового остатка и бензольного ядра α-нафтола.

3. Цветная реакция на гистидин (реакция Паули). К 1 мл 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты в 5%-ном растворе соляной кислоты прибавляют 2 мл 0,5%-ного раствора нитрита калия, сильно встряхивают и немедленно приливают сначала 2 мл 0,01%-ного раствора гистидина, а затем, после перемешивания содержимого пробирки, 6 мл 10%-ного раствора карбоната натрия. Развивается интенсивная вишнево-красная окраска.

При взаимодействии кислого раствора сульфаниловой кислоты с нитритом натрия осуществляется реакция диазотирования и образуется диазобензолсульфоновая кислота:

$$HO_3S-C_6H_4-NH_2 + KNO_2 + HCl \longrightarrow {}^{-}O_3S-C_6H_4-\overset{+}{N}\equiv N + 2H_2O + KCl$$

Сульфаниловая кислота *п-Сульфобензолдиазоний (диазобензолсульфоновая кислота)*

При реакции последней с гистидином образуется соединение вишнево-красного цвета:

$${}^{-}O_3S-C_6H_4-\overset{+}{N}\equiv N + \text{гистидин} + N\equiv\overset{+}{N}-C_6H_4-SO_3^{-} \longrightarrow HO_3S-C_6H_4-N=N-(\text{имидазол-}CH_2-CH(NH_2)-COOH)-N=N-C_6H_4-SO_3H$$

Гистидин *2,5-Бис-п-сульфобензолазогистидин*

4. Цветная реакция на триптофан (реакция Гопкинса-Коле). 1 мл 0,005%-ного раствора триптофана смешивают в пробирке с ровным объемом раствора глиоксиловой кислоты (см. приложение) и добавляют 10 капель 0,04 М раствора сульфата меди (II). Приливают небольшими порциями (по нескольку капель) 2—3 мл концентрированной серной кислоты, охлаждая пробирку каждый раз под водопроводным краном или, лучше, в ванночке со льдом. Оставляют на 10 мин при комнатной температуре и ставят на 5 мин в кипящую водяную баню. Развивается сине-фиолетовое окрашивание.

Триптофан в этой реакции конденсируется с формальдегидом, выделяющимся из глиоксиловой кислоты под действием концентрированной серной кислоты:

$$HOOC-CHO \xrightarrow{H_2SO_4} CO_2 + H-CHO$$

Глиоксиловая кислота — *Формальдегид*

$$2\ \text{Триптофан} + HCHO \xrightarrow{H_2SO_4} \text{Бис-2-триптофанилметан} + H_2O$$

Бис-2-триптофанилметан

Продукт конденсации окисляется до *бис*-2-триптофанилкарбинола:

$$\text{Бис-2-триптофанилметан} \xrightarrow{\text{Окисление}} \text{Бис-2-триптофанилкарбинол}$$

Бис-2-триптофанилкарбинол

Последний в присутствии минеральных кислот образует окрашенные в сине-фиолетовый цвет соли (явление галохромии).

5. Цветная реакция на метионин (по Мак-Карти и Салливану). К 5 мл 0,02%-ного раствора метионина прибавляют при помешивании сначала 1 мл 14,3 н. раствора гидроксида натрия, а затем 0,3 мл свежеприготовленного 10%-

ного раствора нитропруссида натрия. Смесь нагревают 10 мин на водяной бане при температуре 35—40°C. Затем ее охлаждают 2 мин в ледяной воде и добавляют при помешивании 5 мл смеси соляной и фосфорной кислот. Смесь взбалтывают 1 мин и охлаждают водой комнатной температуры в течение 10 мин. Развивается яркая красно-фиолетовая окраска.

6. Цветная реакция на глицин (реакция Циммермана). К 2 мл 0,01%-ного раствора глицина доведенного добавлением 10%-ного раствора щелочи до pH 8, приливают 0,5 мл водного раствора *о*-фталевого диальдегида. Реакционная смесь немедленно окрашивается в ярко-зеленый цвет. Через несколько минут выпадает зеленый осадок.

7. Цветные реакции на пролин. Два наиболее распространенных реагента на присутствие аминокислот — нингидрин (с. 6) и изатин — взаимодействуют с аминокислотой пролином особым образом.

1) *Цветная реакция пролина с нингидрином.* В пробирке к 3 мл 0,01%-ного раствора пролина прибавляют несколько капель 1%-ного раствора нингидрина в 95%-ном ацетоне. Содержимое пробирки перемешивают и нагревают на водяной бане при 70°C в течение 5 мин. Развивается ярко-желтая окраска в результате возникновения продукта конденсации пролина с нингидрином:

O
O
HN
COOH
+ CO_2 + H_2O
Нингидрин *Пролин*

2) *Цветная реакция пролина с изатином.* В пробирке смешивают 0,01%-ный раствор пролина в ледяной уксусной кислоте с 0,03%-ным раствором изатина в ледяной уксусной кислоте (под тягой). Немедленно появляется синее окрашивание.

Предполагается следующий механизм данной реакции:

NH
COOH
NH
NH
+ CO_2 + $2H_2O$

СВОЙСТВА АМИНОКИСЛОТ

Некоторые физические и химические свойства аминокислот (растворимость, образование солей, реакции по карбоксильной и аминной группам и др.) изучаются на практикуме по органической химии. Поэтому здесь будет отмечена лишь одна химическая реакция, представляющая интерес с биохимической точки зрения, а именно взаимодействие аминокислот с сахарами, являющаяся прототипом реакций, осуществляющихся в живой природе.

Оборудование, реактивы. Баня водяная; бумага лакмусовая; пробирки химические; фруктоза (5%-ная) в борной кислоте (2,5%-ной); борная кислота (2,5%-ная); аргинин (3%-ный).

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АРГИНИНА И ФРУКТОЗЫ

В две пробирки берут по 2 мл 5%-ного раствора фруктозы в 2,5%-ном растворе борной кислоты и прибавляют в первую из них 2 мл 3%-ного раствора аргинина, а во вторую — 2 мл дистиллированной воды. В третью пробирку берут 2 мл 3%-ного раствора аргинина и 2 мл 2,5%-ного раствора борной кислоты. Ставят пробирки на несколько минут в кипящую водяную баню. Отмечают различие во времени появления окраски и ее интенсивности в каждой из проб.

Аргинин взаимодействует с карбонильным кислородом молекулы фруктозы как α-аминогруппой, так и δ-гуанидиновой группой. При этом раствор в пробирке, где находилась смесь аргинина и фруктозы, приобретает красно-бурый оттенок. Реакцию ведут в растворе борной кислоты для предупреждения осмоления фруктозы, которое маскирует сахароаминную реакцию.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

Методы количественного определения аминокислот многочисленны и разнообразны. В некоторых случаях определяют суммарное содержание всех аминокислот в гидролизатах белков или экстрактах из биологического материала. Один из таких методов рассмотрен ранее (с. 5). Если плотность окраски с нингидрином аминокислотной вытяжки измерить в специальном приборе — колориметре и сопоставить далее с плотностью окраски, развивающейся при взаимодействии с нингидрином смеси аминокислот известного состава (так называемая стандартная смесь аминокислот), то можно рассчитать количественное содержание аминокислот в исследуемой пробе.

Существует другой вариант этого метода, заключающийся в измерении объема углекислого газа, выделившегося при взаимодействии аминокислот с нингидрином (с. 6). Оксид углерода (IV)

при этом связывают точно измеренным объемом раствора гидроксида бария, оттитровывая раствором соляной кислоты гидроксид бария, не вступивший в реакцию с оксидом углерода (IV). По разности объемов гидроксида бария рассчитывают количество гидроксида бария, пошедшее на взаимодействие с оксидом углерода (IV), а по нему — содержание карбоксильных групп и далее аминокислот.

Карбоксильные группы аминокислот можно количественно учесть также путем титрования спиртовым раствором щелочи (в спиртовой среде) или раствором щелочи в водной среде в присутствии формалина.

Этот метод известен под названием формольного титрования. Наконец, суммарное содержание аминокислот часто определяют путем реакций по аминогруппам. Долгое время был распространен газометрический метод определения α-аминного азота. При взаимодействии аминокислот с азотистой кислотой в присутствии крепкой уксусной кислоты в течение 5 мин осуществляется реакция дезаминирования α-аминокислот с выделением свободного азота, количество которого измеряют в газометрической трубке. Учитывая, что половина его выделяется из аминокислоты, а половина — из нитрита, рассчитывают общую концентрацию α-аминогрупп и, следовательно, аминокислот. Определение ведут в специальном приборе, предложенном Д. Д. Ван-Сляйком, и поэтому этот способ называют методом Ван-Сляйка. Однако в последнее время этот метод уступил место другому методу определения α-аминного азота, так называемому медному способу. Сущность его состоит в том, что α-аминокислоты способны образовывать комплексные растворимые соединения с ионами меди в степени окисления +2, которые в дальнейшем определяют иодометрически (с. 32).

При количественном определении свободных аминокислот в гидролизатах белков и природных экстрактах широко используют цветные реакции (см. предыдущую работу). Для большинства входящих в состав белков аминокислот в настоящее время известна одна или несколько цветных реакций, обеспечивающих определение именно данной, индивидуальной аминокислоты в присутствии всех других аминокислот. К их числу относятся реакция Миллона (на тирозин), реакция Сакагучи (на аргинин) и реакция Гопкинса-Коле (на триптофан). Однако индивидуальные цветные реакции в большинстве случаев не специфичны. Так, например, реакцию Сакагучи дают некоторые производные гуанидина, а реакцию Гопкинса-Коле — ряд производных индола. Поэтому количественное определение аминокислот при помощи цветных реакций не всегда надежно. Как уже упоминалось выше (с. 5), сейчас для этих целей применяется хроматографический метод, позволяющий получить каждую из аминокислот в индивидуальном состоянии и определить ее количество.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ НА БУМАГЕ

Оборудование, реактивы. Фотоэлектроколориметр; ножницы; карандаш простой; бумага хроматографическая; пластинки стеклянные (3 × 32 см) — 4 шт.; микропипетки для хроматографии; пробирки с притертыми пробками; бюретки прямые с краном на 25 мл; стандартная смесь аминокислот (см. приложение); этиловый спирт (75%-ный), насыщенный медным купоросом; этиловый спирт (96%-ный).

Берут лист хроматографической бумаги размером 32×58 см и на расстоянии 8 см от его короткого края проводят простым карандашом линию. Затем ее делят на неравные отрезки в соответствии с прилагаемой схемой (рис. 11), выделяют стрелками границы нанесения стандартной и испытуемых смесей и делают соответствующие надписи тоже простым карандашом.

Рис. 11. Схема разметки бумаги при количественном определении аминокислот методом хроматографии распределения на бумаге:

I, II, IV, V—линии нанесения испытуемых смесей; III — линии нанесения стандартной смеси аминокислот.

Бумагу фиксируют над поверхностью стола (рис. 12). На линию старта, ограниченную стрелками, наносят сначала стандартную смесь аминокислот (см. приложение) при помощи микропипетки, изготовленной из капиллярной трубки с сечением капилляра около 1 мм. Микропипетка имеет тонко оттянутый слегка отшлифованный на наждачном камне кончик. При прикосновении заполненной пипеткой к бумаге и быстром отнятии должно оставаться пятнышко диаметром не более 2 мм. После полного высыхания пятен операцию повторяют. Так поступают несколько раз подряд, пока весь раствор не будет перенесен на стартовую линию. В результате стандартная аминокислотная

смесь оказывается нанесенной на исходную позицию тонкой полосой.

Измеряют массу нанесенного раствора, для чего взвешивают пипетку, заполненную стандартной смесью (до нанесения раствора), и пустую (после нанесения раствора). На бумагу наносят 0,0200—0,0300 г стандартного раствора (рис. 12), что обеспечивается при заполнении капиллярной полости пипетки на 2—3 см.

Рис. 12. Схема нанесения раствора на бумагу при количественном определении аминокислот:

Б — бумага; С — фиксирующее стекло; П — микропипетка; Л — линии нанесения раствора (каждое маленькое пятнышко на ней получено за счет одноразового прикосновения микропипеткой).

Затем заполняют чистую пипетку испытуемой смесью аминокислот, взвешивают ее и наносят смесь на линию старта с соответствующей пометкой. Качественный состав и количественное соотношение аминокислот в испытуемых смесях известны только руководителю практикума и должны быть в результате проведения данной работы найдены практикантами. Каждый работающий анализирует одну испытуемую смесь. Следовательно, одна хроматограмма готовится четырьмя студентами, которые наносят в соответствующие позиции на ней исследуемые ими смеси. Стандартная смесь является общей.

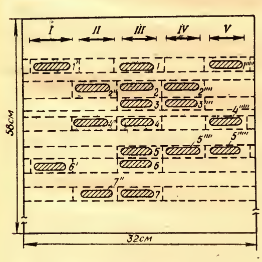


Рис. 13. Схема расположения аминокислот на хроматограмме:

I — испытуемая смесь № 1: I' — лизин; 6' — валин; II — испытуемая смесь № 2: 2'' — глицин; 4'' — аланин; 7'' — лейцин; III — стандартная смесь: 1 — лизин; 2 — глицин; 3 — глутаминовая кислота; 4 — аланин; 5 — тирозин; 6 — валин; 7 — лейцин; IV — испытуемая смесь № 3: 2'''' — глицин; 3'''' — глутаминовая кислота; 5''' — тирозин; V — испытуемая смесь № 4; 1'''' — лизин; 4''''' — аланин; 5'''' — тирозин.

Проявление хроматограммы и обнаружение аминокислот осуществляют ранее описанным способом (с. 9—11).

Идентификацию аминокислот, содержащихся в испытуемой смеси, ведут по совпадению на хроматограмме позиций, занимаемых аминокислотами стандартной и неизвестной смеси (рис. 13).

Для определения количественного содержания аминокислот в испытуемых смесях хроматограмму расчерчивают простым карандашом так, чтобы лежащие на одном уровне окрашен-

ные зоны, соответствующие одной и той же аминокислоте, оказались заключенными внутри примерно равных прямоугольников. Пунктирные линии на рисунке 13 показывают, как размечается хроматограмма для последующего количественного анализа. Очерченные участки бумаги вырезают и помещают в пробирки, номера которых должны соответствовать номерам пятен на хроматограмме. В каждую пробирку приливают из бюретки по 10 мл 75%-ного раствора этилового спирта, насыщенного сульфатом меди. Пробирку закрывают пробкой и, периодически перемешивая, добиваются полного перехода кирпично-красной окраски (медная соль сине-фиолетового Руэмана) с бумаги в раствор. На это уходит 15—20 мин. Оптическую плотность стандартного и исследуемых растворов измеряют против 75%-ного раствора этилового спирта с сульфатом меди на фотометре (марки ФМ-1) или фотоэлектроколориметре (марки ФЭК-М или подобной) с зеленым светофильтром (540 нм). Во избежание неточности из-за возможного загрязнения волокнами бумаги растворы перед фотометрированием отсасывают (фильтруют) через ватный фильтр.

Количественное содержание аминокислот в исследуемом растворе рассчитывают по соотношению экстинкций исследуемой и стандартной проб.

Допустим, что в стандартной смеси содержится 1,8 мг глицина в 1 мл и на стартовую полосу нанесено 0,0200 г этого стандартного раствора. Следовательно, на хроматограмму поступило (1,8·0,0200) 0,036 мг, или 36 мкг глицина. Условимся далее, что оптическая плотность окрашенных растворов составила 0,288 для стандарта и 0,336 для неизвестной смеси. Тогда содержание глицина в исследуемой смеси, нанесенной на хроматограмму, составит [(36 · 0,0336) : 0,288] 42 мкг. Если далее принять, что исследуемая смесь взята на хроматограмму в количестве, например, 0,0250 г, то содержание глицина в 1 мл испытуемого раствора составит (42 : 0,0250) 1680 мкг или 1,68 мг/мл.

Перечень обнаруженных в неизвестной смеси аминокислот и все расчеты по их количественному определению заносят в рабочий журнал.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИННОГО АЗОТА МЕДНЫМ СПОСОБОМ

Оборудоваиие, реактивы. Фильтры бумажные; колбы мерные иа 25 мл (2 шт.); пипетки с меткой иа 1,2 и 10 мл; бюретки прямые с краном иа 25 или 50 мл; вороики для фильтроваиия; колбы конические иа 100 мл (4 шт.); цилиидр мериый с иосиком иа 10 мл; раствор хлорида меди (II) (27,3 г в 1 л раствора); раствор фосфата иатрия (68,5 г $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ в 1 л раствора или 64,5 г $Na_2HPO_4 \times$ $\times 12H_2O$ растворяют в 500 мл дистиллироваииой воды, из которой кипячеиием удален CO_2, и добавляют 7,2 г NaOH с последующим доведеиием объема раствора до 1 л дистиллироваииой водой); боратиый буфериый раствор (28,6 г тетрабората иатрия растворяют в 750 мл воды, добавляют 50 мл 1 н. раствора соляиой кислоты и доводят водой до 1 л; pH 8,8); суспеизия фосфата меди (смешивают одии объем раствора хлорида меди (II) с двумя объемами раствора фосфата иатрия и

приливают два объема боратного буфера; суспензию готовят только перед работой в необходимом объеме); тимолфталеин (0,25%-ный) в этиловом спирте (50%-ном); 0,1 н. раствор $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ (из этого раствора разбавлением готовится 0,01 н. раствор, титр которого устанавливают по точному раствору 0,01 н. иодата калия); крахмал (1%-ный); иодид калия (10%-ный); уксусная кислота (конц.); гидроксид натрия (0,5 н.); глицин (1%-ный).

В мерную колбу на 25 мл берут 2 мл исследуемого раствора (1%-ный раствор глицина), добавляют 2 капли тимолфталеина и по каплям 0,5 н. раствор гидроксида натрия до слабо-голубого окрашивания (pH раствора 10,2). После этого добавляют 10 мл суспензии фосфата меди, хорошо перемешивают. При исчезновении осадка следует добавить еще 5 мл суспензии. Раствор в колбе доводят до метки водой, тщательно перемешивают многократным переворачиванием колбы и отфильтровывают избыток фосфата меди через плотный фильтр. Фильтрат должен быть совершенно прозрачным. Этого добиваются многократным фильтрованием. Из фильтрата пипеткой берут две пробы по 10 мл в конические колбы для титрования, подкисляют 0,4 мл концентрированной уксусной кислоты, добавляют 6—8 мл 10%-ного раствора иодида калия и выделившийся иод титруют 0,01 н. раствором гипосульфита. Крахмал 1—2 мл (20—40 капель) на 100 мл раствора добавляют в тот момент, когда титруемый раствор примет соломенно-желтую окраску. Титрование продолжают до исчезновения появившейся после добавления раствора крахмала синей окраски.

Ставят контрольное определение, в котором вместо гликокола берут такой же объем воды. Количество гипосульфита, затрачиваемое на контрольный раствор, вычитают из такового в опыте.

Химизм процесса при определении аминного азота медным способом сводится к следующему. При взаимодействии натриевой соли глицина или других аминокислот с суспензией фосфата меди образуется окрашенная в синий цвет хорошо растворимая комплексная медная соль глицина либо иных аминокислот:

$$6\,H_2N-CH_2-COOH + Cu_3(PO_4)_2 \longrightarrow 3\,[(H_2N-CH_2-COO)_2Cu] + 2H_3PO_4$$

Фосфорная кислота связывается боратным буфером, и реакция идет до конца.

В фильтрате после отделения избытка фосфата меди оказываются лишь медные соли аминокислот (за исключением цистина, медная соль которого нерастворима), и, следовательно, по

количеству меди, перешедшей в фильтрат, можно определить содержание аминокислот.

При добавлении к фильтрату концентрированной уксусной кислоты последняя вытесняет из медной соли более слабую аминокислоту:

$$(H_2N-CH_2-COO)_2Cu + 2CH_3COOH \longrightarrow 2H_2N-CH_2-COOH + (CH_3COO)_2Cu$$

Под действием иодоводородной кислоты, образовавшейся из иодида калия в кислой среде, ион меди в степени окисления +2 восстанавливается; образуется нерастворимый иодид меди (I) и свободный иод:

$$2(CH_3COO)_2Cu + 4HI \rightarrow 2CuI + 4CH_3COOH + I_2$$

Вследствие нерастворимости иодида меди (I) в слабокислой среде этот процесс также идет до конца. Таким образом, количество выделившегося свободного иода эквивалентно количеству медных солей аминокислот. Концентрацию свободного иода определяют титрованием выделившегося иода раствором гипосульфита:

$$\underset{\text{Гипосульфит}}{2Na_2S_2O_3} + I_2 \rightarrow 2NaI + \underset{\text{Тетратионат натрия}}{Na_2S_4O_6}$$

По уравнению реакции 0,5 моль выделившегося иода соответствует 1 моль меди, который в свою очередь эквивалентен 28 г аминного азота. С другой стороны, 0,5 моль иода реагирует с одним эквивалентом гипосульфита. Следовательно, один эквивалент гипосульфита соответствует 28 г аминного азота. Отсюда 1 мл 0,01 н. раствора гипосульфита отвечает 0,28 мг аминного азота.

Умножением величины 0,28 мг на затраченный объем 0,01 н. раствора гипосульфита (минус контроль) получают число миллиграммов аминного азота во взятом объеме (10 мл) испытуемого раствора. После этого делают пересчет на весь объем раствора в колбе и сравнивают найденную массу аминного азота с тем, что должно быть в 2 мл исследуемого раствора гликокола.

ПЕПТИДЫ

Выделение индивидуальных пептидов (см. учебник, с. 53—57) представляет одну из труднейших задач в биохимии, не решенную еще до конца. Тем не менее применение в последнее время метода молекулярных сит (с. 42), хроматографии (с. 9) и электрофореза (с. 45) позволило разделить сложные смеси природных пептидов на индивидуальные соединения. Особенно эффективными при выделении пептидов оказались метод высоковольтного (до 10 000 В) электрофореза и метод ионного обмена на силь-

нокислотных полистироловых сульфокатионитах типа Дауэкс-50 или КУ-2. Хорошие результаты дает также хроматография распределения на бумаге. Не утратили своего значения и старые способы выделения некоторых пептидов, основанные на их избирательном осаждении в виде солей тяжелых металлов. Ниже приводится один из них.

ВЫДЕЛЕНИЕ ГЛУТАТИОНА ИЗ ДРОЖЖЕЙ

Оборудование, реактивы. Центрифуга; установка для вакуумной перегонки; фильтры бумажные; дрожжи пекарские; ступка фарфоровая; палочки стеклянные; цилиндры мерные с носиком на 50 мл; стакан химический на 1 л; набор пробирок стеклянных химических; пипетки с меткой на 2 мл; приборы для получения углекислого газа и сероводорода; чашки фарфоровые; эксикатор с краном с серной кислотой; эксикатор с краном с гидроксидом натрия; колба для фильтрования под вакуумом (Бунзена); воронка для отсасывания (Бюхнера); серная кислота (конц.); эфир серный; серная кислота (0,5 н.); суспензия оксида меди (I); спирт этиловый (70, 90 и 96%-ный и абсолютный); гидроксид натрия; глутатион.

К 1 кг грубо измельченных пекарских дрожжей, помещенных в большую фарфоровую ступку, приливают смесь, составленную из 70 мл 90%-ного спирта и 10 мл концентрированной серной кислоты. Смесь хорошо перемешивают и затем прибавляют 40 мл серного эфира, тщательно растирая осадок в ступке в течение нескольких минут. Далее приливают 200 мл 0,5 н. раствора серной кислоты, переносят содержимое в большие стеклянные центрифужные пробирки и отделяют осадок центрифугированием при 6000 *g*. Надосадочную жидкость сливают в литровый стакан, промывают осадок в пробирке 0,5 н. раствором серной кислоты и присоединяют ее к ранее полученной надосадочной жидкости. Содержимое стакана нагревают до 50°С и осаждают глутатион в виде медной соли прибавлением суспензии оксида меди (I). Последнюю получают незадолго до опыта путем кипячения раствора глюкозы (берется в избытке) с Фелинговой жидкостью, тщательно промывая красный осадок оксида меди (I) сначала декантацией, а затем на фильтре. Суспензию оксида меди (I) готовят путем размешивания 1 г оксида меди (I) и 30 мл воды. Добавление суспензии ведут порциями по 2 мл каждый раз, хорошо перемешивая содержимое стакана стеклянной палочкой. Первые порции оксида меди (I) растворяются нацело, а потом начинает выпадать шелковистый осадок медной соли глутатиона. Так как последняя растворима в присутствии избытка солей оксида меди (I), необходимо по возможности точно определить момент прекращения выпадения осадка. С этой целью после прибавления 8 мл суспензии дают осадку осесть и надосадочную жидкость декантируют, добавляя к ней новые порции суспензии оксида меди (I) до появления багряно-красного окрашивания, не исчезающего после кратковременного перемешивания. После отстаивания в течение ночи надосадочную

жидкость декантируют. Осадки соединяют и отделяют центрифугированием, промывая их многократно в центрифужных пробирках свежепрокипяченной водой.

Медную соль глутатиона разлагают, насыщая, суспензию ее в 20—30 мл воды сероводородом. Черный осадок сульфида меди (II) отделяют центрифугированием и промывают сероводородной водой. Объединенные порции надосадочной жидкости переносят в перегонную колбу роторного испарителя и отгоняют воду в вакууме при температуре 25—30°C до объема в несколько миллилитров. Остаток переносят в выпаривательную чашку, помещают в вакуум-эксикатор над серной кислотой и высушивают до образования прозрачного стекловидного осадка. Последний растворяют в 5—6 мл воды. Полученный раствор смешивают с половинным объемом спирта, прибавляя небольшой избыток его так, чтобы образовался спиртовой слой на поверхности раствора. Чашку помещают в вакуум-эксикатор над щелочью; добавляют в нее несколько кристаллов глутатиона в качестве затравки. Кристаллы, появляющиеся через несколько часов, отделяют на воронке Бюхнера, промывают 70%-ным, а затем 96%-ным и, наконец, абсолютным спиртом. Выход — 0,5—0,75 г.

ОБНАРУЖЕНИЕ В СОСТАВЕ ГЛУТАТИОНА ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ, ЦИСТЕИНА И ГЛИЦИНА

Оборудование, реактивы. Шкаф сушильный; баня водяная; напильник линейка; карандаш простой; трубки толстостенные стеклянные (диаметр 0,5—0,6 см); чашки выпаривательные; промывалка; оборудование и реактивы для определения аминокислот методом хроматографии распределения на бумаге (с. 9); глутатион; соляная кислота (20%-ная и 1%-ная); бутанол; уксусная кислота, нингидрин (1%-ный) в ацетоне (95%-ном).

Около 10 мг кристаллов глутатиона помещают в пробирку длиной около 10 см, изготовленную из толстостенной стеклянной трубки диаметром 0,5—0,6 см. Туда же добавляют 1 мл 20%-ного раствора соляной кислоты, следя за тем, чтобы весь глутатион в ней растворился. Пробирку запаивают на паяльной горелке, помещают в сушильный шкаф и нагревают в нем в течение 24 ч (допускается нагревание с перерывами) при температуре 105°C. По охлаждении ампулу вскрывают, переносят ее содержимое в выпаривательную чашку, смывая 2—3 раза стенки ампулы дистиллированной водой. Содержимое чашки упаривают досуха под тягой на водяной бане. Сухой остаток растворяют в 1—2 мл 1%-ного раствора соляной кислоты, тщательно обмывая им внутреннюю поверхность чашки почти до верхнего края ее. Специальной микропипеткой (с. 9) наносят 0,02—0,05 мл полученного раствора на зону старта хроматограммы (с. 9) и проявляют последнюю в течение ночи смесью бутанола, уксусной кислоты и

воды (15 : 3 : 7). Затем хроматограмму снимают, отмечают границу фронта проявителя и высушивают. Аминокислоты, содержащиеся в гидролизате глутатиона, обнаруживают нингидрином (с. 11). Идентификацию аминокислот осуществляют по коэффициентам подвижности (R_f), которые рассчитывают в соответствии с прописью с. 14). Для цистеина, глицина и глутаминовой кислоты в данном проявителе R_f соответственно равны 0,03; 0,13 и 0,17.

ОБНАРУЖЕНИЕ НАЛИЧИЯ ПЕПТИДНЫХ СВЯЗЕЙ В МОЛЕКУЛЕ ГЛУТАТИОНА

Оборудование, реактивы. Набор пробирок стеклянных химических; глутатион; гидроксид натрия (10-%ный и 30%-ный); сульфат меди (1%-ный); мочевина.

Несколько кристаллов глутатиона помещают в пробирку, прибавляют 2—3 мл 30%-ного раствора гидроксида натрия и хорошо перемешивают. Затем из капельницы добавляют несколько капель 1%-ного раствора сульфата меди и снова хорошо перемешивают. Развивается интенсивное сине-фиолетовое окрашивание, свидетельствующее о наличии пептидных, т. е. —CO—NH—, связей в молекуле глутатиона.

Для сравнения проводят ту же реакцию с биуретом, который легко может быть получен нагреванием мочевины:

$$\underset{\text{Мочевина}}{2\,H_2N-CO-NH_2} \xrightarrow{\text{Нагревание}} NH_3 + \underset{\text{Биурет}}{H_2N-CO-NH-CO-NH_2}$$

Для этого несколько кристаллов мочевины помещают в пробирку и осторожно прокаливают в пламени газовой горелки. По охлаждении приливают в пробирку 10%-ный раствор гидроксида натрия и добавляют несколько капель 1%-ного раствора сульфата меди. После перемешивания развивается сине-фиолетовая окраска.

И в том и в другом случае окраска вызвана образованием комплексного соединения. Согласно М. И. Плехан, детально исследовавшей эту реакцию[1], строение биуретового медного комплекса таково:

```
          O⁻                    O⁻
          |                     |
        ↗ C = NH           HN = C ↖
  HN  <   O  ———→  Cu  ←———  O     >  NH
        ↘ C = NH           HN = C ↙
```

[1] Плехан М. И. Спектрофотометрия биуретовых комплексов как метод исследования полипептидов и белков. — В сб.: «Химия белка». М., 1961, с. 191—244.

Как видно из приведенной выше формулы, биурет в щелочной среде претерпевает полную енолизацию по схеме:

$$H_2N-CO-NH-CO-NH_2 \rightleftharpoons \underset{\displaystyle OH}{HN=\overset{}{C}}-NH-\underset{\displaystyle OH}{C}=NH$$

Две молекулы диенольной формы биурета взаимодействуют с гидроксидом меди (II) и образуют комплексное соединение, в котором координационные связи образованы за счет электронных пар атомов азота иминных групп.

Аналогично построено комплексное соединение меди с енолизованными пептидными группами глутатиона или любого другого полипептида:

R''
CH
C
N
O
N
CHR'''
C—O—Cu
C
OH
R'HC
N
N
C—OH
CHR'''
в цепь
в цепь

Комплексы такого типа обладают преимущественно красной окраской (максимум поглощения в пределах 520—535 нм). В случае образования медных комплексов при участии трех или двух атомов азота окраска их преимущественно фиолетовая и синяя (с максимумами поглощения в пределах 540—580 нм и 615—670 нм соответственно). Поэтому окраска растворов при проведении биуретовой реакции варьирует от синей до красной с преобладанием фиолетовой.

БЕЛКИ И ИХ ОБМЕН

ПРОСТЫЕ БЕЛКИ (ПРОТЕИНЫ)

ВЫДЕЛЕНИЕ, ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ И ОЧИСТКА БЕЛКОВ

Принципы выделения и очистки белков (экстракция, высаливаиие, фракционироваиие с помощью спиртов, электрофорез, хроматография, гельфильтрация, диализ, электродиализ, кристаллизация) рассмотреиы в учебнике (с. 29—39). Ниже приведена характеристика большииства перечисленных способов выделеиия, фракционирования и очистки белков. Из иих широко распространен метод микроэлектрофореза в сиитетическом полиакриламидном геле, находящий все новые и иовые области практического примеиения (биохимия развития, сравнительная биохимия, биохимическая геиетика и т. п.).

ВЫДЕЛЕНИЕ ФИБРОИНА ИЗ КОКОНОВ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

Оборудованне, реактнвы. Шкаф сушнльный; стаканы стеклянные лабораторные с носнком, высокне, на 100 мл; набор пробнрок стеклянных хнмнческнх; стекло часовое; палочки стеклянные; коконы тутового шелкопряда; карбонатно-гндрокарбонатная буферная смесь (см. в тексте); сульфат медн (1%-ный); гндроксид натрня (10%-ный).

Кокои тутового шелкопряда построен из непрерывной шелковой иити длииой около 1 км. Виутреиияя часть иити образована фибрилляриым белком — фиброином (см. учебиик, с. 85—86), а иаружиая — белком серицином, который склеивает отдельиые участки иитей друг с другом, благодаря чему сохраияется форма кокоиа. В отличие от фиброииа серицин хорошо растворим в воде и особенно в слабых щелочных растворах. Поэтому чистый фиброин легко выделить путем растворения сериииа при иагревании коконов.

Один кокои тутового шелкопряда взвешивают на аналитических весах (куколка из него должиа быть удалеиа) и помещают в стакаичик на 100 мл, куда приливают 50 мл карбонатно-гидрокарбонатного буфериого раствора (смесь равных объемов 0,05 М, растворов карбоиата и гидрокарбоната натрия). Содержимое стаканчика кипятят в течение 30 мин. Часть жидкости

берут в пробирку и проводят биуретовую пробу (с. 62) на присутствие в ней белка — серицина. Остальную жидкость сливают и отбрасывают. Промывают фиброин теплой дистиллированной водой три раза, помещают его на часовое стекло и высушивают в сушильном шкафу при температуре 60°C. По охлаждении взвешивают фиброин на аналитических весах. Рассчитывают процентное содержание фиброина и серицина в оболочке кокона.

ПОЛУЧЕНИЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКОГО ЯИЧНОГО АЛЬБУМИНА

Оборудование, реактивы. Цилиндры мерные на 50 и 100 мл; воронки стеклянные; палочки стеклянные; колба для фильтрования под вакуумом (Бунзена) с воронкой Бюхнера; стакан стеклянный лабораторный с носиком на 50 мл; фильтры бумажные; универсальная индикаторная бумага; 2 свежих яйца; сульфат аммония (насыщ.); сульфат аммония (порошок); уксусная кислота (4%-ная).

Белок двух очень свежих куриных яиц тщательно отделяют от желтков и помещают в мерный цилиндр на 100 мл с притертой пробкой. Приливают равный объем заранее приготовленного (путем растворения 757 г соли в 1 л воды при слабом нагревании на водяной бане) насыщенного раствора сульфата аммония, закрывают пробкой и хорошо перемешивают.

При полунасыщении раствора сульфатом аммония (см. учебник, с. 83—84) в осадок выпадают глобулины. Их отфильтровывают через складчатый фильтр. Фильтрование ведут в другой мерный цилиндр меньшего объема. К прозрачному фильтрату прибавляют тонко растертый порошок сульфата аммония из расчета 13,5 г на 100 мл раствора и длительно перемешивают стеклянной палочкой, добиваясь полного растворения кристаллов. При этом получают 70%-ный раствор сульфата аммония, из которого выпадает в осадок альбумин. Последний отфильтровывают на воронке Бюхнера. Осадок осторожно снимают с фильтра, переносят в химический стакан на 50 мл и растворяют в минимальном объеме воды. К полученному раствору прибавляют по каплям при помешивании 4%-ный раствор уксусной кислоты, контролируя pH полученного раствора по универсальной индикаторной бумаге. По достижении значения pH, 4,7—4,8, к раствору приливают небольшими порциями насыщенный раствор сульфата аммония при постоянном встряхивании до тех пор, пока не появится неисчезающая муть. Стаканчик накрывают чистым стеклом и ставят в холодильник. Через сутки или более выпадают игольчатые кристаллы яичного альбумина.

РАЗДЕЛЕНИЕ АЛЬБУМИНОВ И ГЛОБУЛИНОВ МЕТОДОМ ДИАЛИЗА И ВЫСАЛИВАНИЯ

Оборудование, реактивы. Ступка фарфоровая; воронка стеклянная; стакан стеклянный лабораторный с носиком на 1 л; целлофановый мешочек для диализа; марля; фильтры бумажные; хлорид натрия (10%-ный); нитрат серебра (1%-ный); сульфат аммония; гидроксид натрия (10%-ный); сульфат меди (1%-ный); сульфат аммония (насыщ.); мышечная ткань.

Альбумины и глобулины являются наиболее распространенными в природных объектах белками. Обычно они встречаются вместе, и отделение их друг от друга основано на различной их растворимости в воде и различной высаливаемости минеральными солями.

Альбумины растворимы в воде и в крепких растворах солей (осаждаются лишь при более чем 50%-ном насыщении раствора солью), а глобулины растворимы только в растворах солей средней концентрации (8—15%-ных). В растворах с более высокой и более низкой концентрацией соли растворимость глобулинов уменьшается.

Получение солевой вытяжки белка. 10 г измельченной (пропущенной через мясорубку) мышечной ткани настаивают при помешивании в ступке в течение 10—15 мин с 40—50 мл 10%-ного раствора хлорида натрия. Образуется однородная полужидкая масса, которую фильтруют через двойной слой марли. Первые мутные капли фильтрата сливают снова на фильтр и повторно фильтруют до получения фильтрата без взвешенных в нем частиц. Фильтрование идет медленно. Получают около 15—20 мл прозрачного опалесцирующего окрашенного в розовато-красный цвет раствора. В полученной солевой вытяжке белка содержатся глобулины и альбумины, которые далее разделяют методом диализа или высаливания.

Диализ солевой вытяжки мышечной ткани. Метод диализа основан на неспособности крупных белковых частиц проникать сквозь поры полупроницаемых перепонок (искусственные коллоидные и целлофановые мембраны и естественные животные и растительные перепонки), тогда как другие молекулы и ионы легко проходят через них. Методом диализа пользуются для очистки растворов высокомолекулярных соединений от солей и других веществ.

Белковый раствор, очищенный этим методом, называется диализированным.

Приборы, служащие для диализа, называются диализаторами. Простейшим диализатором может быть мешочек целлофана или коллодия, помещенный в стакан с дистиллированной водой. Для более полного и быстрого осуществления диализа вода в стакане должна быть проточной или периодически заменяться свежей.

Изготовление диализатора. Вырезают из целлофана круг диаметром 9—12 см. Складывают его в форме мешочка, вставляют в отверстие стеклянную трубку (длиной 5—6 см и диаметром 0,5—0,8 см) так, чтобы верхний конец трубки выступал из мешочка на 2—3 см, а нижний был бы погружен внутрь на $^1/_3$ мешочка. Мешочек туго завязывают на трубке шнурком. До работы диализатор следует сохранять наполненным водой и погруженным с помощью держалки для пробирок в стакан с водой. Мешочек должен быть подвешен так, чтобы он не

касался стенок и дна стакана. Перед работой воду из диализатора выливают.

С помощью воронки с тонко оттянутым концом вливают в диализатор 10 мл (не более половины объема мешочка) полученного фильтрата солевой вытяжки и погружают мешочек в литровый стакан с дистиллированной водой. Через 5—10 мин отбирают пипеткой немного воды из стакана и убеждаются в наличии там хлорид-ионов (реакция с раствором нитрата серебра) и в отсутствии белка (биуретовая или миллонова реакция на белки). Сменив воду в стакане, если реакция на хлорид-ионы ярко выражена, продолжают диализ, время от времени проверяя реакцию на хлорид-ионы и белок и меняя воду через каждые 5—10 мин.

Через 1,5—2 ч проба на хлорид-ионы становится отрицательной или очень слабой. Это свидетельствует о завершении диализа, т. е. о почти полной диффузии соли из диализатора в наружный растворитель. В мешочке к этому времени прозрачный ранее фильтрат мутнеет, вследствие выпадения в осадок глобулинов, нерастворимых в дистиллированной воде.

Мешочек вынимают из стакана и содержимое его фильтруют через бумажный фильтр. На фильтре остаются глобулины, в фильтрат переходят альбумины. Проделывают биуретовую реакцию и доказывают наличие обоих белков в осадке и фильтрате (с. 62).

Для осаждения альбуминов к фильтрату добавляют порошкообразный сульфат аммония до насыщения раствора. При таких условиях альбумины выпадают в осадок. Последний отфильтровывают через сухой бумажный фильтр. При полном насыщении сульфатом аммония в растворе не остается белка, в чем можно убедиться, проведя биуретовую реакцию на белки с небольшой порцией фильтрата.

В ы с а л и в а н и е м ы ш е ч н ы х б е л к о в. Разделение белков солевой вытяжки осуществляют также методом высаливания, основанным на способности альбуминов и глобулинов осаждаться при различной концентрации солей. К солевой вытяжке, полученной из мышечной ткани (с. 39), добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония. Выпадает осадок глобулинов. Раствор фильтруют и фильтрат насыщают, добавляя сульфат аммония. Выпадает осадок альбуминов.

РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ МЕТОДОМ ГЕЛЬФИЛЬТРАЦИИ ЧЕРЕЗ СЕФАДЕКС

Применение сефадексов (см. учебник, с. 36—37) для фракционирования сложных белковых смесей типа тех, что характерны для биологических жидкостей (сыворотка крови, гемолимфа беспозвоночных и т. п.) или экстрактов, полученных из животных и растительных тканей, малоэффективно: удается лишь разделить смесь белков на несколько групп. Тем не менее в ряде

случаев это первая стадия при выделении индивидуальных белков.

Кроме первичного фракционирования белковых смесей, фильтрацию через гель сефадекса применяют для обессоливания белков и их концентрирования. Ионы соли, легко проникающие внутрь гранул сефадекса (см. учебник, с. 36—37), задерживаются ими, а белковые молекулы, минуя гранулы, выносятся из колонки с током элюента и выходят в ограниченном объеме его, концентрируясь во много раз. Сефадексы применяют также на заключительных этапах очистки белка от примеси сопутствующего белка, если последний достаточно резко отличается от первого по величине относительной молекулярной массы.

В последнее время сефадексы применяют для определения относительной молекулярной массы белков путем сопоставления величин свободного (т. е. не занятого гранулами сефадекса) и элюируемого (т. е. необходимого для выноса белка из колонки) объемов колонки (с. 85).

Из сказанного ясно, что важнейшее значение при работе методом гельфильтрации, или, как его еще называют, методом молекулярного сита, имеет правильный выбор марки сефадекса.

Сефадексы отличаются различной степенью сшивки молекул декстрана друг с другом (см. учебник, с. 36). Это находит выражение в различной набухаемости гранул сефадекса и пределах эксклюзии (выражаемой значениями относительной молекулярной массы веществ, еще способных входить внутрь гранул сефадекса), в связи с чем и построена их классификация (табл. 1).

Таблица 1. **Характеристика некоторых видов сефадексов**

Марка сефадекса	Предел эксклюзии (в единицах относительной молекулярной массы)	Поглощение воды (в мл/г)	Удельный объем в колонке (в см³/г)	Время полного набухания при комнатной температуре (в ч)	Диапазон фракционирования белков по относительной молекулярной массе (в тыс.)
G- 25	5000	2,5±0,2	4— 6	3	1,0—5,0
G- 50	10 000	5,0±0,3	9—11	3	1,5—30
G- 75	50 000	7,5±0,5	12—15	24	3,0—75
G-100	100 000	10,0±1,0	15—20	48	4,0—150
G-150	150 000	15,0±1,5	20—30	72	5,0—300
G-200	200 000	20,0±2,0	30—40	72	5,0—600

Оборудование, реактивы. Спектрофотометр или фотоколориметр; коллектор фракций или штативы на 150—200 пробирок; штатив лабораторный с набором лапок; колонка для гельфильтрации — стеклянная трубка с оттянутым концом (длина 120 см и диаметр 3 см); стеклянный гвоздь; стеклянная вата; пробирки химические (150—200 шт.); стаканы стеклянные лабораторные с носиком на 200 мл и 2 л; склянка с тубулусом на 5 л; трубки каучуковые (диаметр 0,5—0,7 см); трубки стеклянные (диаметр 0,5—0,7 см); зажим винтовой; сефадекс (G-75); хлорид натрия (0,09 М); соляная кислота (10%-ная); биологическая жидкость (сыворотка крови, гемолимфа насекомых) или тканевый экстракт с содержанием белка 10 мг/мл.

Собирают прибор для проведения опыта в соответствии с рисунком 8 или 9 в зависимости от наличия или отсутствия коллектора фракций. Стеклянную вату, предназначенную для заполнения нижней части колонки для гельфильтрации, предварительно промывают 10%-ным раствором соляной кислоты, а затем дистиллированной водой.

Колонку заполняют гелем сефадекса. Для этого 25 г сефадекса G-75 предварительно заливают в двухлитровом стакане 1,5 л 0,09 М раствора хлорида натрия, хорошо перемешивают и оставляют на 24 ч. Через сутки набухший сефадекс (объем его увеличивается примерно в 15 раз — см. табл. 1) промывают пять раз 0,09 М раствором хлорида натрия путем декантации. Затем стакан с гелем сефадекса помещают в большой вакуумэксикатор и в течение 1,5—2 ч деаэрируют под вакуумом, создаваемым водоструйным насосом. После проведения всех вышеуказанных операций гель готов для заполнения колонки. Объем его составляет примерно 500 см^3. Заполнение колонки гелем сефадекса ведут осторожно, заливая его медленно и непрерывно по стенке колонки, что предохраняет от захвата им пузырьков воздуха. С этой же целью, а также для обеспечения необходимой плотности геля, сразу после внесения сефадекса в колонке создают рабочее давление, подключая к колонке пятилитровую склянку с элюирующим раствором (0,09 М раствор хлорида натрия). Этим раствором немедленно начинают промывку колонки и ведут ее в течение 12 ч.

Содержание белка в растворе, подлежащем гельфильтрации, должно быть около 10 мг/мл. Если указанные данные отсутствуют, содержание белка в препарате определяют любым доступным методом (с. 66), после чего осуществляют соответствующее разведение, добавляя 0,09 М раствор хлорида натрия. При работе с гемолимфой тутового шелкопряда, например, содержащей 5—6% белка, ее разводят 0,09 М раствором хлорида натрия в 5—6 раз. Получают гемолимфу от гусениц тутового шелкопряда середины пятого личиночного возраста. Гемолимфу выпускают через надрезы ложноножек в охлаждаемую льдом пробирку. Для опыта достаточно 2 мл гемолимфы, получаемых от двух-трех личинок. Удовлетворительные результаты получают при использовании гемолимфы, хранящейся в запаянных ампулах, куда добавлено небольшое количество фенилтиомочевины для ингибирования действия тирозиназы. При использовании сыворотки крови человека (получение см. с. 49), содержащей 6,5—7,6% белка, степень ее разведения должна быть несколько выше, чем гемолимфы.

Перед внесением образца, предназначенного для фракционирования белков, отключают склянку с элюирующим раствором от колонки. Слегка ослабляют зажим внизу колонки и устанавливают уровень элюирующего раствора вровень с поверхностью сефадекса. Осторожно, стараясь ни в коем случае не взму-

тить верхний слой сефадекса, пипеткой наслаивают на него 10 мл разведенной гемолимфы (примерно 100 мг белка) или иного препарата, подготовленного для фракционирования белков, т. е. 2% от общего объема геля в колонке. Ослабляя зажим в нижней части колонки, нанесенный образец вводят в сефадекс и, крайне осторожно наслоив по каплям или по стенке при помощи пипетки элюент, подключают к колонке склянку с 0,09 М раствором хлорида натрия и начинают элюцию.

Собирают фракции по 5 мл при помощи коллектора фракций или в пробирки с метками на 5 мл. Элюцию ведут со скоростью 1 мл в минуту, что достигается изменением высоты склянки с элюирующим раствором относительно колонки. Элюцию заканчивают после сбора 150—160 фракций. Содержание белка в исследуемых фракциях определяют спектрофотометрически, измеряя экстинкцию каждой пробы на спектрофотометре СФ-4А при 280 нм.

На основании полученных данных строят кривую (рис. 14). Фракции, входящие в отдельные пики (с номерами от 32 до 40; от 41 до 70; от 92 до 108 и от 109 до 121), объединяют, подвергают диализу и высушивают лиофильно или осаждают многократным избытком 96%-ного этанола. Отделяют осадки центрифугированием или фильтрованием и обезвоживают их абсолютным этанолом и сухим серным эфиром.

Содержание белка во фракциях, снятых с колонки, можно определить также по методу Лоури (с. 75). Ввиду сравнительно невысокого содержания белка в большинстве порций элюата, выходящего из колонки, применять рефрактометрический и биуретовый методы в данной работе нецелесообразно.

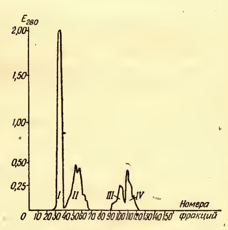


Рис. 14. Выходная кривая, построенная по результатам спектрофотометрического определения белков во фракциях, снятых с колонки в процессе фракционирования белков гемолимфы тутового шелкопряда методом фильтрации через гель сефадекса G-75, E_{280} — экстинкция при 280 нм; I—IV — белковые фракции.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ БЕЛКОВ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

В белковых молекулах содержатся самые разнообразные радикалы (см. учебник, с 47—51). Некоторые из них способны ионизироваться. В результате в местах расположения свободных аминогрупп в белковой молекуле возникают радикалы, заря-

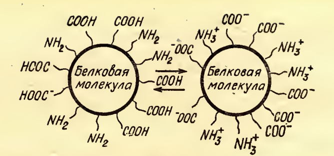


Рис. 15. Схема, показывающая механизм возникновения суммарного электрического заряда белковой молекулы. Свободные карбоксильные группы принадлежат дикарбоновым аминокислотам, а аминные — диаминокислотам.

женные положительно, а в точках локализации карбоксильных групп — отрицательно. В зависимости от их соотношения молекула белка в целом приобретает суммарный положительный или отрицательный заряд (рис. 15).

Значительное количество природных белков содержит в своем составе несколько бо́льше дикарбоновых аминокислот, чем диаминокислот. Поэтому они заряжены отрицательно и обладают в электрическом поле анодной подвижностью. Такие белки называют кислыми белками. Другие белки имеют в своем составе избыток диаминокислот, заряжены положительно и в электрическом поле движутся к катоду — это основные белки.

Число ионизированных групп в белке может быть увеличено или уменьшено при изменении pH среды. В кислой среде (при избытке ионов водорода) диссоциация карбоксильных групп подавляется и суммарный отрицательный заряд белковой молекулы падает. Наоборот, в щелочной среде сокращается ионизация катионных групп и суммарный положительный заряд белка уменьшается. Поэтому, изменяя pH среды, можно добиться уменьшения или увеличения подвижности белка в электрическом поле. Значение pH среды, при котором белок полностью утрачивает способность мигрировать к аноду или катоду, называется изоэлектрической точкой белка.

Скорость перемещения белковых молекул в электрическом поле зависит не только от величины суммарного заряда. Она зависит от разности потенциалов, относительной молекулярной массы белка и от его взаимодействия с молекулами или ионами среды, в которой осуществляется перенос белка. Последняя зависимость обусловливается, в частности, формой белковых молекул, природой и концентрацией буферного раствора. Перечисленные факторы специфичны для каждого индивидуального белка, что обеспечивает ему ту или иную степень подвижности в электри-

ческом поле при той или иной разности потенциалов. Именно этот принцип и лежит в основе фракционирования белков методом электрофореза.

Существует несколько разновидностей электрофоретического метода фракционирования белков: 1) электрофорез в жидкой среде; 2) электрофорез в блоках (крахмальном, агар-агаровом, полиакриламидном т. п.); 3) электрофорез на бумаге. Наибольшей разрешающей способностью, под которой понимают число выявляемых в анализируемом материале белковых фракций, отличается электрофорез в полиакриламидном геле. Наименьшая разрешающая способность присуща жидкостному электрофорезу, тогда как электрофорез белков на бумаге в этом отношении занимает промежуточное положение.

Разделение белков сыворотки крови методом электрофореза на бумаге

Оборудование, реактивы. Прибор для электрофореза; центрифуга; баня водяная; шкаф сушильный; пинцет; ванночки эмалированные (24×35 см; применяются в фотографии); бумага хроматографическая; линейка; карандаш простой; микропипетки; стекла покровные; рамка деревянная для сушки электрофореграмм; кровь; буферные смеси (рецепты приготовления см. в описании работы); сине-черный краситель; уксусная кислота (ледяная); метиловый спирт; фенол; сульфат цинка; уксусная кислота (2%-ная).

Электрофорез белков на бумаге проводят в специальном приборе. Наиболее часто применяют аппараты для горизонтального электрофореза на бумаге марок ЭФА-1 (электрофоретический аппарат, модель 1), ЭМИБ и УЭФ (производства экспериментально-конструкторских мастерских института физиологии им. А. А. Богомольца, г. Киев).

Устройство прибора для горизонтального электрофореза на бумаге показано на рисунке 16.

Так как электрофоретический аппарат работает под напряжением 200—400 В, перед началом опыта его надежно заземляют. После этого в ванночки 2 заливают буферный раствор. Уровень последнего должен быть немного ниже перегородок *11*, через которые во всю их длину и в той, и в другой ванночке перекидывают несколько сложенных вместе полосок фильтровальной бумаги так, чтобы их концы были погружены в буферный раствор. Уровень буферных растворов в обеих ваночках должен быть одинаков. Его выравнивают при помощи специального сифона, который прилагается к прибору ЭМИБ. Концы сифонной трубки погружают в обе ванночки одновременно, засасывают буферный раствор в нее, закрывают всасывающий патрубок и оставляют в таком состоянии сифон на несколько

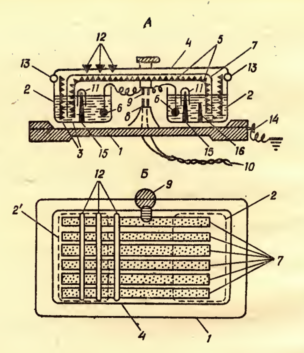


Рис. 16. Устройство электрофоретического аппарата марки ЭМИБ:

А — вид сбоку (разрез); Б — вид сверху. *1* — основаиие прибора; *2* — ваиночки для буфериого раствора; *3* — основаиие электрофоретической камеры; *4* — крышка электрофоретической камеры; *5* — пластииы с выступамн, поддерживающие бумагу; *6* — электроды; *7* — бумага фильтровальная; *8*, *9* — коитактное устройство; *10* — электрнческие провода к блоку управления; *11* — полоски фильтровальиой бумаги, соединяющие отсеки ваниочкн; *12* — отверстия в крышке для нанесеиия растворов на электрофореграмму, закрываемые резииовыми вкладышами; *13* — уплотнительиые резииовые кольца; *14* — клемма для заземления; *15* — подвнжиые перегородки; *16* — неподвижная перегородка.

минут. Затем отверстие всасывающего патрубка открывают, дают раствору стечь и сифон снимают.

В качестве буферного раствора используют одну из смесей.

1. *Трис*-буфер (pH 8,9): 60,5 г триоксиметиламинометана *(трис)*, 6,0 г. этилендиаминотетрауксусной кислоты и 4,6 г борной кислоты растворяют в 1 л воды. В этом буфере получают до девяти фракций белков сыворотки крови на электрофореграмме.

2. Веронал-мединаловый буфер (pH 8,6; μ 0,1): 3,68 г диэтилбарбитуровой кислоты (веронал) и 20,6 г диэтилбарбитурата натрия (мединал) растворяют в 1 л дистиллированной воды. При

работе с данным буфером выявляют до пяти белковых фракций сыворотки крови.

3. Фосфатный буфер (pH 7,8; μ 0,07): 0,29 г $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ и 3,25 г Na_2HPO_4 растворяют в 1 л дистиллированной воды. На электрофореграмме обнаруживают до пяти фракций белков сыворотки крови.

4. Боратный буфер (pH 8,6): 0,8 г тетрабората натрия и 4,65 г борной кислоты растворяют в 1 л дистиллированной воды. В такой системе можно определить четыре-пять белковых фракций сыворотки крови на электрофореграмме.

Берут лист быстровпитывающей хроматографической бумаги и отрезают от него полоску шириной 3 см и длиной 40 см. По краям полоски на расстоянии 5 см от края отмечают простым карандашом катодный (—) и анодный (+) концы (рис. 17). Поперек полоски проводят простым карандашом две пунктирные линии (на расстоянии 4,5 см от каждого края полоски) и одну сплошную линию (на расстоянии 18 см от ее катодного конца). Здесь же, т. е. на катодной половине электрофореграммы, отмечают условия проведения опыта (температура, разность потенциалов, продолжительность, характер и количество материала, нанесенного на электрофореграмму), а также фамилию экспериментатора, дату и т. п.

Прикладывая к обрезу линейки полоску бумаги, изгибают ее по пунктирной линии и помещают в электрофоретическую камеру. Загнутые вниз концы бумажной полоски должны погрузиться в буферный раствор. В камере электрофоретического аппарата можно разместить 5—7 полосок бумаги. Поэтому опыт в ней могут выполнять одновременно 5—7 студентов. С помощью пинцета располагают полоски бумаги в камере так, чтобы они не касались друг друга, а линии старта на них (т. е. сплошные линии на расстоянии 18 см от катодного края) были на одном уровне. Закрывают крышку электрофоретиче-

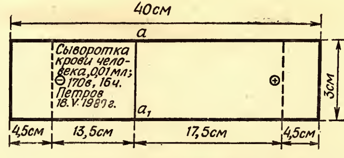


Рис. 17. Схема разметки электрофореграммы перед проведением опыта: aa_1 — линия старта.

ской камеры и оставляют бумагу пропитываться буферным раствором на 40 мин.

Получают сыворотку крови для нанесения на электрофореграмму. Для этого свежую кровь помещают в центрифужную пробирку, выдерживают, периодически встряхивая, 30 мин при 30°С в водяной бане и центрифугируют в течение 15 мин при 3000 g. При этом осаждается фибрин (в виде нитей) и форменные элементы крови. Сливают надосадочную жидкость, представляющую собой сыворотку крови желтоватого цвета. Сыворотку из свежей крови можно также получить иным путем: 10—15 мл крови собирают в стаканчик и перемешивают деревянной палочкой. Фибрин выделяется в виде волокон и наматывается на палочку. Форменные элементы удаляют центрифугированием в течение 15 мин при 3000 g.

Убедившись в том, что бумажные полоски в камере полностью пропитались буферным раствором, их еще раз выравнивают с помощью пинцета.

Микропипеткой отмеряют 0,01 мл сыворотки крови и распределяют ее по одному из краев покровного стекла, которое держат под углом 30° к поверхности стола. Лучше применять покровные стекла со шлифованными краями. Затем покровное стекло располагают вертикально, причем край его с нанесенной сывороткой должен быть внизу, а сыворотка — на левой стороне стекла. Сохраняя вертикальное положение покровного стекла, нижний край его устанавливают на середину линии старта (рис. 18). Плотно прижав стекло к бумаге, наклоняют его влево под углом 45° и дают сыворотке полностью впитаться в бумагу. Снова придают стеклу вертикальное положение и резким движением отрывают его от бумаги.

Рис. 18. Этапы нанесения исследуемого раствора на электрофореграмму:

I — нанесение раствора на край покровного стекла (стрелка указывает направление движения носика пипетки); *II* — положение стекла перед нанесением раствора на бумагу (темная толстая линия внизу обозначает отмеренную порцию раствора, распределенного по нижней грани стекла); *III* — расположение стекла на линии старта электрофореграммы (отрезки, ограниченные стрелками, должны быть равны); *IV* — положение стекла во время впитывания раствора; *V* — положение стекла перед снятием его с электрофореграммы.

По окончании нанесения сыворотки на все полоски электрофоретическую камеру закрывают. Всю работу по нанесению испытуемых растворов проводят быстро, чтобы избежать подсыхания бумаги. При работе на аппарате марки ЭМИБ замыкают подвижный контакт (рис. 16) и включают блок питания в сеть. Электрофоретическое разделение белков сыворотки крови ведут при напряжении 150—170 В и силе тока не более

1 мА на каждую полоску во избежание перегрева и денатурации белков. Электрофорез проводят при комнатиой температуре в течение 16—18 ч без перерыва.

Когда время, отведениое на электрофорез, истечет, снижают на блоке питания напряжеиие, выключают его и отсоединяют от электрической сети. Нельзя проводить никаких операций в электрофоретической камере при включенном блоке питания.

Рис. 19. Рамка для сушки электрофореграмм.

1—продольная стенка рамки; *2*—поперечная стенка рамки; *3*—электрофореграмма; *4*—кнопки для прикрепления электрофореграмм.

Электрофореграммы извлекают из камеры и переносят на деревянную рамку такой же длины, как камера. Концы электрофореграмм подсушивают фильтровальной бумагой и прикалывают к деревянной рамке (рис. 19). Рамку с электрофореграммами помещают в сушильный шкаф иа 20 мин при 110°С для фиксации положения белковых фракций иа бумаге путем переведения белков в нерастворимое состояиие.

Белки иа электрофореграммах обнаруживают посредством окрашивания амидошварцем 10В, кислотиым сине-черным или бромфеноловым сииим красителями. Для этого электрофореграммы укладывают на дно ванночки на расстояиии 1—2 см друг от друга и осторожно заливают 1 л раствора красителя (см. ниже). Нужно следить, чтобы полоски в процессе окрашивания белков ие накладывались друг на друга. Изредка покачивая ваниочку или приподнимая электрофореграммы пиицетом, перемешивают краситель. По истечении необходимого времеии (см. ииже) раствор красителя сливают обратио в скляику, так как его можио использовать миогократно. В ту же ванночку заливают 1 л раствора для отмывания избытка красителя (см. ниже), выдерживают электрофореграммы в нем необходимое время (см. ниже) и заменяют его на свежий раствор. Указанную операцию по замене раствора для отмывки избытка красителя иа свежий повторяют 3—4 раза, в связи с чем необходимо иметь 4—5 л этого раствора. Отмывку ведут до тех пор, пока фои электрофореграммы ие станет совершенно белым, а белковые фракции иа электрофореграмме будут выделяться в виде окрашеиных полос. По окоичании отмывки электрофореграммы высушивают на воздухе. Растворы для отмывки можио использовать многократно, поэтому их сохраняют.

Для обнаружения на электрофореграммах белковых фракций с помощью кислотного сине-черного красителя (или амидошварца 10В, который отличается от первого лишь наличием NH_2-группы вместо NO_2-группы), готовят 0,02%-ный рас-

Кислотный сине-черный краситель

твор его на смеси метилового спирта и ледяной уксусной кислоты в отношении 9 : 1 (по объему). В указанном растворе электрофореграммы выдерживают в течение 20 мин (см. выше). Избыток сине-черного красителя удаляют с бумаги кислым раствором фенола (40 мл расплавленного фенола смешивают со 100 мл ледяной уксусной кислоты и 860 мл воды). Готовят 4—5 порций указанного раствора по 1 л (см. выше). В каждой порции раствора для отмывки избытка красителя электрофореграммы держат 20—30 мин.

Для обнаружения на электрофореграммах белковых фракций применяют также бромфеноловый синий краситель:

Бромфеноловый синий (тетрабромфенолсульфофталеин)

При этом 100 мг его растворяют в смеси состоящей из 900 мл воды, 50 мл ледяной уксусной кислоты и 50 г $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Электрофореграммы держат в этом растворе в течение 8—20 ч (в течение ночи). Избыток красителя отмывают раствором уксусной кислоты, который применяют порциями по 1 л, сменяя 4—5 раз (см. выше), Каждый раз электрофореграммы выдерживают в нем по 20—30 мин.

В зависимости от типа примененного буферного раствора на электрофореграмме проявляется 4—9 окрашенных пятен, каждому из которых соответствует та или иная фракция белков сыворотки крови. На рисунке 20 показано типичное расположение белковых фракций сыворотки крови человека при разделении их методом электрофореза на бумаге. В любом случае выявляются минимум четыре белковые фракции, а именно α-,

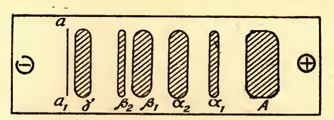


Рис. 20. Расположение белковых фракций сыворотки крови человека на электрофореграмме:

aa_1 — линия старта; γ — гаммаглобулин; β_1 и β_2 — бетаглобулины; α_1 и α_2 — альфаглобулины; А — альбумин.

β- и γ-глобулины и альбумин. Чем лучше прошло разделение, тем больше обнаруживается дополнительных фракций в зоне расположения глобулинов, каждая из которых может дать от двух до трех и более дробных фракций.

На электрофореграмме простым карандашом обозначают выявленные белковые фракции. Часть электрофореграммы, где сосредоточены белки, зарисовывают в рабочий журнал, переносят туда же все обозначения. Электрофореграмму сохраняют для количественного определения белковых фракций в сыворотке крови (см. ниже).

Фракционирование методом микроэлектрофореза в полиакриламидном геле белков тканей животного происхождения

Метод электрофореза в полиакриламидном геле обладает большей разрушающей способностью по сравнению с методами, где используются другие гели. Полиакриламидный гель прозрачен, обладает значительной механической прочностью, однороден по составу, химически инертен. Он дает возможность исследовать растворы разной концентрации и в небольших объемах (до 0,001 мл), использовать охлаждение и проводить разделение очень быстро (в течение 60—70 мин). Чаще других используют метод вертикального микроэлектрофореза. В нем сочетаются две системы полиакриламидных гелей: крупнопористая и мелкопористая. В слое крупнопористого геля происходит отделение клеточного материала и уплотнение белков, что ценно при работе с тканевыми белками, так как упрощает предварительную их обработку, в то время как другие варианты метода требуют более тщательной очистки тканевых белков. Разделение белков происходит в мелкопористом геле. Изменяя соотношение компонентов в смеси мономеров, можно регулировать величину ячеек получаемого полимера трехмерной структуры. Это дает возможность проводить разделение кислых и основных белков, рибонуклеиновых кислот и т. д.

Оборудование, реактивы. Прибор для микроэлектрофореза; универсальный источник питания; центрифуга рефрижераторная с фактором разделения не менее 12 000 *g*; гомогенизатор; мешалка магнитная; лампа накаливания на 500 (2 шт.) или 1000 вт; скальпель; пинцет; ножницы препаровальные с острыми концами; игла металлическая (диаметр 0,3—0,5 мм, длина 10—15 см); трубки стеклянные (диаметр 0,6 см); трубки стеклянные, оттянутые с одной стороны в капилляр; микропипетки на 0,1 мл; пробирки стеклянные конические; лейкопластырь; лед; акриламид; N,N′-метиленбисакриламид; персульфат аммония; тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД); рибофлавин; триоксиметиламинометан (трис); глицин; гексациано-(III) феррат калия; хлорид натрия; парафин; соляная кислота (1 н.); фосфорная кислота (1М); трихлоруксусная кислота (7%-ная); амидовый черный 10В (0,1%-ный) в смеси (10 : 1 : 30) метанола, ледяной уксусной кислоты и воды; смесь метанола, ледяной уксусной кислоты и воды (10:1:30); краситель, закатно-желтый (Sunset yellow FCF Supra); линейный полиакриламид (6 г акриламида, 0,0005 г рибофлавина и 0,05 мл тетраметилэтилендиамина в 100 мл воды полимеризуют на свету в течение 15—20 ч); сыворотка крови; гемолимфа насекомых или специально приготовленные тканевые экстракты (с. 55—56) с содержанием белка от 2 до 4 мг/мл.

Приготовление колонок полиакриламидного геля. Структура сополимера, возникающего при взаимодействии акриламида с N,N′-метиленбисакриламидом приведена в учебнике (с. 35). N,N′-метиленбисакриламид получают из акриламида по следующей прописи. В круглодонную колбу на 200 мл, снабженную обратным холодильником, вносят 28,4 г акриламида, 6 г параформальдегида, 120 мл дихлорэтана и 12 капель концентрированной соляной кислоты. Смесь нагревают до слабого кипения и кипятят в течение 20 мин, после чего быстро фильтруют через воронку для горячего фильтрования, используя в качестве фильтра стеклянную вату. Из полученного прозрачного, безцветного (или слегка зеленоватого) раствора при охлаждении выкристаллизовывается метиленбисакриламид. После отделения осадка на стеклянном фильтре маточный раствор упаривают и после охлаждения его получают еще некоторое количество продукта. Метиленбисакриламид перекристаллизовывают из дихлорэтана и хранят в холодильнике.

Реакция сополимеризации акриламида с N,N′-метиленбисакриламидом ускоряется как химическими катализаторами — персульфатом аммония $(NH_4)_2S_2O_8$ и тетраметилэтилендиамином, так и фотохимическими катализаторами — солнечным светом или сильным искусственным освещением (две лампы накаливания на 500 вт) в присутствии рибофлавина. При химической полимеризации условия более стабильны и получаемый гель однороднее. Такой полимеризацией получают нижний слой геля. Верхний слой полиакриламидного геля получают при посредстве фотохимической полимеризации.

Для приготовления нижнего и верхнего слоя геля используют следующие исходные растворы (их можно хранить месяц в темных склянках в холодильнике): А — 1 н. раствор соляной кислоты — 48 мл; *трис* — 36,3 г; ТЕМЕД — 0,46 мл; вода — до 100 мл (pH 8,9); В — акриламид — 30 г; бисакриламид — 0,8 г;

гексациано (III)-феррат калия — 0,015 г; вода до 100 мл; C — 1М раствор фосфорной кислоты[1] — 25,6 мл; *трис* — 5,7 г; вода до 100 мл (pH 6,9); D — персульфат аммония — 0,14 г; вода — 100 мл; E — акриламид — 10 г; бисакриламид — 2,5 г; вода — до 100 мл; F — рибофлавин — 0,004 г; вода — 100 мл.

Для получения нижнего геля используют смесь исходных растворов в следующем соотношении: 1 часть раствора A, 2 части раствора B, 1 часть воды и 4 части раствора D. Для получения верхнего геля используют исходные растворы в следующем соотношении: 1 часть раствора C, 2 части раствора E, 1 часть раствора F и 4 части воды. Смеси готовят непосредственно перед проведением полимеризации. Процесс полимеризации ведут без доступа кислорода. С этой целью нижние концы колонок, нарезанных из стеклянных трубок диаметром 0,6 см, длиной 8 см и зашлифованных на наждачном камне по линии обреза, до внесения в них смесей мономеров закрывают лейкопластырем и заливают парафином. На трубках наносят метки на расстоянии 6,5 и 7 см от заклеенного конца. После прибавления в колонку полимеризуемой смеси до метки 6,5 см на нее сразу наслаивают по стенке колонки из капиллярной трубки дистиллированную воду — слой высотой 0,8 см. Полимеризация нижнего слоя продолжается в течение 1 ч. После этого капилляром осторожно снимают воду и заливают только что приготовленную смесь для верхнего слоя геля до метки 7 см. Снова наслаивают воду и ведут полимеризацию на солнечном свете. Процесс длится 10 мин. После удаления воды колонку закрывают пробкой и оставляют до внесения исследуемого раствора. Одновременно готовят не менее 6—8 колонок (по числу гнезд в аппарате для микроэлектрофореза).

Рис. 21. Схема прибора для фракционирования белков методом электрофореза в полиакриламидном геле:

1 — колонка с полиакриламидным гелем; *2* — резиновая пробка для крепления колонки; *3* — полиэтиленовый стакан; *4* — стеклянная трубка для монтажа электродов; *5* — катод; *6* — анод; *7* — стеклянный стакан; *8* — буферные растворы; *9* — магнитный ротор; *10* — магнитная мешалка; *11* — охлаждающая смесь.

---

[1] 1М раствор фосфорной кислоты готовят разбавлением 68,3 мл 86%-ной кислоты водой до 1 л.

Монтаж прибора для электрофореза в полиакриламидном геле. Главную часть прибора для электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 21) представляет блок из 6—8 вертикальных колонок, заполненных полиакриламидным гелем (см. выше) и закрепленных вертикально на одинаковой высоте. Такой блок собирают[1], используя полиэтиленовый конический стакан объемом 0,5 л. В дне его просверливают по окружности 6—8 отверстий, в которые вставляют резиновые пробки от пенициллиновых склянок. В пробках от пенициллиновых склянок проделывают отверстия, в которые плотно вставляют колонки с полиакриламидным гелем так, чтобы верхняя часть их на 3 см от дна полиэтиленового сосуда входила внутрь его. В центре дна полиэтиленового сосуда проделывают еще одно отверстие, в которое вставляют стеклянную трубку с платиновыми электродами. Один электрод (катод) выводят в полиэтиленовый сосуд на уровне 4 см от дна. Другой электрод (анод) пропускают внутрь стеклянной трубки и выводят из нее на уровне нижнего конца колонок с полиакриламидным гелем. Собранный блок помещают в стеклянный стакан, на дне которого располагают магнитный ротор. Верхняя часть полиэтиленового сосуда должна выступать из стакана на 2—3 см. Всю эту установку ставят в стеклянную банку, которую заполняют льдом и размещают на магнитной мешалке.

Подготовка материала для электрофоретического разделения. Личинки тутового шелкопряда (10—20 шт.) погружают в 75%-ный этиловый спирт для стерилизации, ополаскивают дистиллированной водой и высушивают фильтровальной бумагой. Через надрезы ложноножек выпускают гемолимфу в охлажденные льдом центрифужные пробирки, в которых содержится по 7 мг стрептомицина и фенилтиомочевины. Стрептомицин служит антисептиком, а фенилтиомочевина ингибирует активность тирозиназы. Когда подавляющая часть гемолимфы вытекла, личинку вскрывают продольным разрезом вдоль брюшка. Тонким пинцетом быстро извлекают шелкоотделительные железы и кишечник. Последний на 1—2 мин погружают в охлажденный до 0°С физиологический раствор. Отмыв в дистиллированной воде каркас с жировым телом от гемолимфы и подсушив его фильтровальной бумагой, осторожно извлекают жировое тело тупой стороной скальпеля. Освободив жировое тело от трахей и мальпигиевых сосудов, помещают его в сосуд для гомогенизации, охлажденный смесью льда и хлорида натрия до 2—5°С. В качестве антисептика используют также стрептомицин. Кишечник вскрывают продольным разре-

[1] Для проведения микроэлектрофореза можно использовать электрофоретическую камеру типа ОЕ-110, изготовляемую приборостроительным комбинатом «Лабор» (ВНР) и поставляемую в комплекте с источником питания ИПЭ-500—0,15 Львовского завода биофизических приборов. Охлаждение камеры льдом не предусмотрено. Поэтому ее помещают в холодильник.

зом, с помощью двух тонких пинцетов очищают от химуса, споласкивают в дистиллированной воде и, подсушив на фильтровальной бумаге, помещают в сосуд для гомогенизации, охлажденный смесью льда и хлорида натрия. Все операции проводят быстро: длительное промывание тканей в дистиллированной воде ведет к потере некоторых растворимых белков, специфичных для ткани или органа, а замораживание ткани с последующим оттаиванием сопровождается денатурацией лабильных компонентов белков. Выделив необходимое количество ткани из личинок и взвесив ее, гомогенизируют ткань в охлажденном сосуде примерно 10 с. Для гомогенизации большинства тканей используют стеклянные медицинские шприцы на 20 мл с заранее подогнанными к ним тефлоновыми пестиками. Гомогенизацию каркаса тела и особенно шелкоотделительных желез осуществляют в замороженном состоянии растиранием в ступке в присутствии небольшого количества буфера (см. ниже). Длительная гомогенизация, большое число оборотов тефлонового пестика, быстрые перемещения пестика сверху вниз и обратно в конечном счете ведут к денатурации лабильных белков. Каждая ткань требует индивидуального режима обработки.

Гомогенаты тканей переносят скальпелем в предварительно охлажденные центрифужные пробирки на 10 мл. Одновременно с гомогенатами тканей центрифугируют гемолимфу на рефрижераторной центрифуге при 12 000 *g* 20 мин. при температуре от +0,5 до —0,5°С. В надосадочной жидкости определяют содержание белков по методу Лоури (с. 75) и разводят ее *трис*-глициновым буфером до концентрации белков в 2—4 мг/мл. Для приготовления *трис*-глицинового буфера (pH 8,6) берут 6,0 г триоксиметиламинометана (трис) и 28,8 г глицина, растворяют их в воде и доводят объем до 1 л дистиллированной водой. Этот же буферный раствор при разведении в 5 раз используют для заправки электродных камер прибора для микроэлектрофореза (рис. 21). Такой разведенный буферный раствор называют электродным буфером. Его ионная сила равна 0,075.

Проведение электрофореза. В колонку полиакриламидного геля микропипеткой вносят 0,1 мл исследуемого раствора, содержащего 200—400 мкг белка. Добавляют 0,1 мл раствора линейного полиакриламида в качестве антиконвекционной среды и 5 мкг закатно-желтого красителя в качестве индикаторной краски, по движению которой контролируют ход электрофореза. Тщательно все перемешивают тончайшей стеклянной палочкой с шариком на конце. Затем добавляют еще 2 капли раствора линейного полиакриламида в качестве защитного покрытия. Антиконвекционной средой может служить также 20%-ный раствор сахарозы или сефадекс G-100.

Колонки осторожно заполняют доверху *трис*-глициновым электродным буферным раствором и закрепляют в пробках полиэтиленового сосуда (рис. 21). Затем заливают в полиэтиленовый

сосуд электродный буферный раствор до отверстия, через которое из центральной стеклянной трубки выведен электрод (катод), и закрывают сосуд крышкой. Снимают скальпелем лейкопластырь с нижних концов колонок и погружают блок в стеклянный стакан, заполненный электродным буфером до отметки, что обеспечивает погружение в буфер на 2—3 см нижней части колонок и нижнего электрода. Стеклянный стакан помещают в стакан со льдом большего размера (рис. 21), который установлен на магнитной мешалке. Мешалку включают.

Прибор для электрофореза подключают к универсальному источнику питания. Для разделения белков тканей шелкопряда оптимален следующий режим: сила тока — 6 мА на колонку, напряжение — от 175 до 300 В, длительность электрофореза — 60—70 мин, температура — не выше 5°С. В качестве источников питания можно использовать блоки питания от аппаратов для электрофореза на бумаге (с. 46). Условия при фракционировании белков животного происхождения близки к приведенным ниже. При работе с белками растительного происхождения сила тока устанавливается на уровне 4 мА на колонку при напряжении 400—600 В при сохранении приведенных выше температуры и времени. В процессе электрофореза необходимо следить за постоянством силы тока; напряжение в применяемых источниках питания взаимосвязано с силой тока, проходящего через сечение колонок.

Электрофорез заканчивают, когда зона индикаторной краски окажется на расстоянии 4—6 мм от нижнего конца колонки. Этот момент в разных колонках может наступить в разное время, и поэтому для проведения точных, сопоставительных исследований колонки, где электрофорез завершен, изымают из блока, доводя процесс в остальных до конца. Во время снятия колонки прибор отключают.

По окончании электрофореза прибор сразу разбирают, вынимают колонки из гнезд полиэтиленового стакана извлекают из них гель. Отслаивание геля от стенок стеклянной трубки проводят тонкой металлической иглой, изготовленной из стальной проволоки. Колонку на время погружают в ванночку с дистиллированной водой. Позицию индикаторной краски отмечают прокалыванием геля в этом месте тонкой проволочкой или стеклянным капилляром. Гелевую колонку помещают в пробирку и быстро дважды промывают дистиллированной водой. Затем ее заливают 7%-ным раствором трихлоруксусной кислоты для фиксации зон расположения белков. В этом реагенте колонку выдерживают от 30 до 60 мин, а затем трижды по 10 мин промывают дистиллированной водой. Замечено, что, чем лучше прошла фиксация, тем быстрее и лучше отмывается гель от красителя впоследствии.

Обнаружение белковых фракций. Расположение фиксированных трихлоруксусной кислотой белковых фрак-

ций на колонке полиакриламидного геля определяют, окрашивая их амидошварцем 10В. С этой целью гелевые колонки опускают в 0,1%-ный раствор амидошварца 10В в смеси метанола, уксусной кислоты и воды (10 : 1 : 30) на 1 ч. В результате вся колонка окрашивается в темный цвет, однако только белковые фракции связывают краситель прочно. От остальной части геля он отмывается смесью метанола, уксусной кислоты и воды (10 : 1 : 30), заменяемой многократно. Электрофореграммы, на которых белковые фракции выступают в виде темных полос, можно длительно хранить в холодильнике при температуре 3—5°С в отмывающей смеси.

В тканях шелкопряда этим методом выявляется 16—32 белковые фракции. Схема расположения некоторых из них приведена на рисунке 22.

Каждая белковая фракция может быть охарактеризована по относительной электрофоретической подвижности (ОЭП). ОЭП белковых фракций рассчитывают, деля длину пути, пройденного фракцией, на длину пути, пройденного индикаторной краской. Тот и другой путь измеряют с точностью до десятых долей миллиметра, а ОЭП высчитывают с точностью до сотых долей. Шкала ОЭП приведена на рисунке 22.

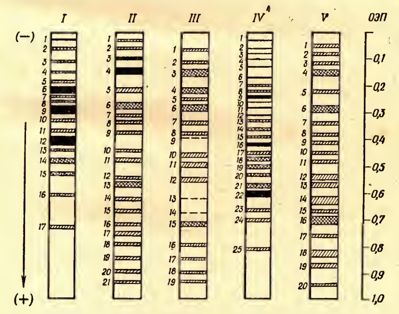


Рис. 22. Схема расположения белковых фракций тканей личинок V возраста тутового шелкопряда на колонках полиакриламидного геля: *I* — гемолимфа; *II* — жировое тело; *III* — стенка кишечника; *IV* — шелкоотделительная железа; *V* — каркас тела; 1—25 — номера белковых фракций; ОЭП — шкала величин относительной электрофоретической подвижности; различия в концентрации белковых фракций отмечены штриховкой разной интенсивности.

Хорошо отмытые гелевые колонки с проявленными белковыми окрашенными фракциями можно сканировать с помощью микрофотометра МФ-4 или ИФО-451, которые дополнительно оснащают держателем для стеклянной трубки, куда вкладывают, заливая водой, гелевые колонки (см. ниже, с. 80). По полученным графикам гравиметрически (вырезая и взвешивая на аналитических весах отдельные пики, соответствующие белковым фракциям) или иным методам получают данные для расчета относительного содержания каждой фракции. Относя эти величины к общему содержанию белка, поступившего на колонку, рассчитывают абсолютное содержание каждой фракции.

Данные, полученные в результате проведения фракционирования белков исследуемой смеси, оформляют в рабочем журнале графически, используя рисунок 22 как образец. Против каждой фракции слева указывают ее номер, а справа — значение ОЭП.

Фракционирование методом микроэлектрофореза в полиакриламидном геле белков хлоропластов и цитоплазмы растительных клеток

Оборудование, реактивы. Аппаратура и реактивы для фракционирования белков животного происхождения (с. 52); гомогенизатор Уорринга; марля; сахароза (0,5М); гидрокарбонат калия (0,05М); тритон (1%-ный) X −100 (может быть заменен аналогичным детергентом).

15 г промытых листьев измельчают в гомогенизаторе с 30 мл сахарозно-гидрокарбонатной смеси, представляющей 0,5 М раствор сахарозы в 0,05 М растворе гидрокарбоната калия (pH 7,6). Полученный гомогенат отжимают через четыре слоя марли и фильтрат центрифугируют при 1500—2000 *g* в течение 15 мин для удаления неразрушенных клеток, ядер и обломков клеточных оболочек. Осадок отбрасывают, а надосадочную жидкость центрифугируют при 3000 *g* в течение 10 мин. Надосадочную жидкость, полученную после второго центрифугирования, используют для фракционирования содержащихся в ней цитоплазматических белков (ЦБ). Осадок хлоропластов взмучивают и промывают 0,05 М раствором гидрокарбоната калия в центрифужной пробирке, центрифугируя третий раз при 3000 *g* в течение 10 мин. Промывную жидкость отбрасывают, а осадок промытых хлоропластов используют для получения растворимых белков хлоропластов (РБХ) и структурных белков хлоропластов (СБХ). Все операции, начиная от измельчения листьев и заканчивая промывкой хлоропластов, ведут при температуре от −1 до +5°С.

Для получения фракции растворимых белков осадок промытых хлоропластов заливают 1 мл *трис*-глицинового буфера, перемешивают и помещают в ледяную баню на 1 ч, периодически встря-

хивая. Полученную суспензию центрифугируют при 12 000 *g* в течение 15 мин и надосадочную жидкость, содержащую растворимые белки хлоропластов, используют для их электрофоретического фракционирования.

Для полного удаления растворимых белков из осадка его промывают охлажденным до 0°С *трис*-буфером в той же центрифужной пробирке, центрифугируют и надосадочную жидкость отбрасывают. Осадок заливают охлажденным до 0°С *трис*-глициновым буфером, содержащим 1% тритона Х—100, взмучивают и помещают пробирку в ледяную баню на 1 ч периодически встряхивая ее. Тритон Х—100, как детергент, ослабляет гидрофобные взаимодействия, что способствует экстракции структурных белков хлоропластов, которые подвергают разделению методом микроэлектрофореза в полиакриламидном геле, предварительно отделив нерастворимый остаток центрифугированием в рефрижераторной центрифуге при 12 000 *g* в течение 15 мин.

Электрофоретическое фракционирование ЦБ, РБХ и СБХ ведут в соответствии с прописью, приведенной на странице 53. Из экстракта, содержащего ЦБ, на колонку наносят 0,2 мл раствора, РБХ — 0,15 мл и СБ — 0,1 мл.

Обнаружение белков также осуществляют методом, изложенным выше (с. 57). Вместо 0,1%-ного раствора амидошварца 10В для окраски растительных белков часто применяют 0,2%-ный раствор кумасси голубого. Однако надо иметь в виду, что несколько большая чувствительность этого метода сопровождается длительной и трудной отмывкой красителя от материала гелевой колонки.

Результаты, полученные при фракционировании ЦБ, РБХ и СБХ, оформляют в виде трех схем, где расположение каждой белковой фракции соответствует вычисленному значению ее ОЭП (рис. 23). Сопоставляя три схемы друг с другом, делают вывод о степени специфичности белков, подвергнутых анализу субклеточных фракций растительной клетки.

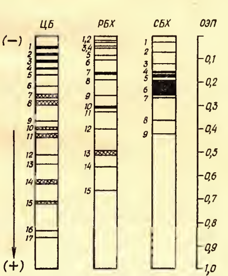


Рис. 23. Схема расположения на колонках полиакриламидного геля цитоплазматических белков, а также растворимых и структурных белков хлоропластов листьев шелковицы:

ЦБ — цитоплазматические белки; РБХ — растворимые белки хлоропластов; СБХ — структурные белки хлоропластов; ОЭП — значения величин относительной электрофоретической подвижности; 1—17 — номера белковых фракций.

Фракционирование белков методом изоэлектрофокусирования на пластинах полиакриламидного геля

Оборудование, реактивы. Прибор «Мультифор» фирмы LKB (Швеция); исходные растворы для приготовления гелевых пластин — 29,1%-ный раствор перекристаллизованного акриламида, 0,9%-ный раствор N, N[1]-метиленбисакриламида, 0,004%-ный раствор рибофлавина, фиксирующий раствор (в смеси из 150 мл 96%-ного этанола и 350 мл дистиллированной воды растворяют 17,25 г сульфосалициловой кислоты и 57,5 г трихлоруксусной кислоты); 0,12%-ный раствор Кумасси R-250 или G-250; отмывочная смесь (ледяная уксусная кислота, 96%-ный этанол, вода в соотношении 1 : 10 : 30); 17%-ный раствор сахарозы; амфолины со значением pH от 3,5 до 10,0; фосфорная кислота (1 М); гидроксид натрия (1 М).

Приготовление пластин полиакриламидного геля. На фирменную толстую стеклянную пластину (26 × 12,5 см) помещают лист писчей бумаги того же размера, накладывают на него тонкую тщательно вымытую стеклянную пластину (26 × 12,5 см), располагают на краю тонкой пластины фигурную каучуковую прокладку толщиной 2,5 мм и накрывают вторым тщательно вымытым стеклом (26 × 12,5 см). Края пластин скрепляют двенадцатью широкими зажимами (4 шт. по каждому продольному и 2 шт. по каждому поперечному краю). Пластины устанавливают вертикально так, чтобы сочленение каучуковой прокладки оказалось вверху. Через зазор, образующийся при поднятии концов каучуковой прокладки в месте стыка, заливают между пластинами свежеприготовленную смесь, состоящую из 10 мл 29,1%-ного раствора акриламида, 10 мл 0,9%-ного раствора N,N′-метиленбисакриламида, 0,4 мл 0,004%-ного раствора рибофлавина, 36 мл 17%-ного раствора сахарозы и 2,8 мл раствора амфолинов со значением pH от 3,5 до 10,0. Осторожно покачивая пластины, добиваются полного удаления пузырьков воздуха из-под верхней части каучуковой прокладки. Полимеризацию геля ведут при освещении лампой дневного света, что занимает около 2 ч. Завершение процесса полимеризации контролируют по подвижности пузырька воздуха, оставшегося в углублении каучуковой прокладки в верхней части установки. По завершении полимеризации полиакриламидного геля зажимы снимают, удаляют каучуковую прокладку и, переведя систему в горизонтальное положение, между поверхностью геля и верхним толстым стеклом вводят при помощи шприца воду, что обеспечивает отслаивание верхнего стекла. Тонкое стекло с располагающимся на нем слоем полиакриламида снимают с бумажной прокладки и, если необходимо, обрезают неровности геля по краю пластины. Для фракционирования белков используют половину полученного геля во избежание выхода из строя источника питания. С этой целью на расстоянии 13 см от поперечного края пластины делают скальпелем разрез, подслаивают шприцем воду под одну из двух частей слоя полиакриламида, снимают ее с пластины, покрывают полиэтиленовой пленкой и хранят в полиэтиленовом мешке в холодильнике. Оставшуюся часть закрепленного геля вместе со стеклом помещают на охлаждаемую панель прибора.

Ф р а к ц и о н и р о в а н и е б е л к о в. На часть гелевой пластины, обращенной к аноду прибора, накладывают по всей ее длине на расстоянии 5 мм от края смоченный в 1 М растворе фосфорной кислоты фитиль (прилагается к прибору). Аналогично этому на сторону гелевой пластины, обращенную к катоду, накладывают фитиль, смоченный 1 М раствором гидроксида натрия. На равном расстоянии от анодного и катодного края гелевой пластины размещают 6 коротких (0,5 × 8,0 мм) фитилей, пропитанных различными исследуемыми белковыми экстрактами, содержащими около 1 мг белка в 1мл. На гелевую пластину устанавливают пластину с вмонтированными в нее платиновыми электродами, следя за тем, чтобы последние совместились с анодным и катодным фитилем соответственно. Закрывают прибор крышкой, включают водяное охлаждение, соединяют прибор с источником питания и задают силу тока, равную 24 мА. Через каждые 10 мин в течение 30 мин повторно устанавливают силу тока в 24 мА, а затем в течение 1 ч ведут изоэлектрофокусирование белков, не корректируя силу тока, которая за это время падает примерно до значения 8 мА. Напряжение при изоэлектрофокусировании изменяется сопряженно задаваемыми величинами силы тока в пределах от 400 до 800 В.

О б н а р у ж е н и е б е л к о в н а п л а с т и н а х. По окончании изоэлектрофокусирования отключают источник питания, извлекают гелевую пластину из прибора, отслаивают полиакриламидный гель от стеклянной подложки, вводя шприцем воду между слоем геля и стеклом, и помещают гелевую пластинку в ванночку с фиксирующим раствором на 30 мин. Фиксирующий раствор смывают, трижды промывают гелевую пластинку дистиллированной водой и заливают раствором Кумасси *R*-250 на 10 мин. После сливания раствора Кумасси гелевую пластинку заливают отмывочной смесью, удаляя выпавшие хлопья ватным или марлевым тампоном. Через 1 ч отмывочную смесь заменяют на свежую и оставляют на ночь. Белковые фракции на гелевой пластине, мигрировавшие как к аноду, так и к катоду, выявляются в виде сине-голубых полос. Разрешающая способность метода выше, чем таковая при обычных вариантах пластинчатого электрофореза в полиакриламидном геле, так как фракционирование белков осуществляется не только в результате того или иного пробега к аноду или катоду, но и за счет фиксирования расположения белковых фракций на пластине в соответствии со значениями pH в тех или иных зонах и изоэлектрическими точками белковых фракций.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА БЕЛКИ

Методы качественного обнаружения белков основаны на двух типах реакций: а) по пептидным связям белковой молекулы; б) по аминокислотным радикалам ее.

Примером реакции первого типа служит биуретовая реакция (с. 63). Примерами реакций второго типа являются многочисленные цветные реакции на радикалы аминокислот, некоторые из которых рассмотрены ранее (с. 21), а остальные будут приведены ниже. По характеру цветных реакций второго типа можно судить до некоторой степени о составе белков.

Оборудование, реактивы. Встряхиватель; центрифуга; баня водяная; термометр лабораторный; кипятильники; фильтры бумажные; марля; колбы конические на 250 мл; набор пробирок стеклянных химических; пипетки, градуированные на 10 мл; стаканы стеклянные лабораторные с носиком на 100 и 250 мл; воронки стеклянные; лакмусовая бумага; свежее яйцо; свежее говяжье мясо; молоко; пшеничная мука; грена тутового шелкопряда; хлорид натрия (10%-ный); сульфат аммония (насыщ.); гидроксид натрия (10%-ный и 30%-ный); сульфат меди (1%-ный); нингидрин (1%-ный) в ацетоне (95%-ном); α-нафтол (0,2%-ный, спиртовой раствор); гипобромит натрия (см. приложение); реактив Миллона (см. приложение); ледяная уксусная кислота; серная, соляная и азотная кислоты (конц.); желатина (раствор); глиоксиловая кислота (см. приложение); формальдегид (2,5%-ный); нитрит натрия (0,05%-ный и 0,5%-ный); сульфаниловая кислота (1%-ная); карбонат натрия (10%-ный); соляная кислота (5%-ная); нитропруссид натрия (5%-ный); аммиак (конц.); раствор плюмбита натрия (к 1 мл раствора ацетата свинца добавляют по каплям раствор щелочи до растворения образующегося сначала осадка гидроксида свинца); пикриновая кислота (насыщ.); *трис*-глициновый буфер (pH 8,6; приготовление см. с. 55); карбонат натрия.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ БЕЛКОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ КАЧЕСТВЕННЫХ РЕАКЦИЙ

Неразбавленный белок куриного яйца. Отделяют белок трех куриных яиц от желтков. Считая, что масса белка в одном яйце в среднем равна 33 г, получают около 100 мл неразбавленного раствора белков куриного яйца. Этот раствор содержит 88% воды, 1 % углеводов и 0,5% минеральных веществ; остальное приходится на белок. Таким образом, полученный неразбавленный белок куриного яйца представляет собой примерно 10%-ный раствор белка.

Разбавленный раствор яичного альбумина. Белок одного куриного яйца после отделения от желтка хорошо взбивают и затем смешивают в колбе при встряхивании с десятикратным объемом дистиллированной воды. Раствор фильтруют через двойной слой смоченной водой марли или кусок стиранного полотна, помещенных в воронку. Отфильтровывают раствор яичного альбумина; в осадке остается яичный глобулин. Учитывая, что концентрация альбумина в белке куриного яйца составляет около 6%, полученный разбавленный раствор яичного альбумина является примерно 0,5%-ным.

Белки мяса. Помещают в стакан 40—50 г пропущенного через мясорубку обезжиренного мяса, добавляют 80—100 мл 10%-ного раствора хлорида натрия и оставляют смесь стоять 15—20 мин при частом помешивании. Отфильтровывают через бумажный складчатый фильтр или через двойной слой марли

окрашенную в красный цвет жидкость. В растворе содержится главным образом мышечный альбумин и глобулин.

Белки молока. К 50 мл свежего молока добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония. При этом выпадают в осадок глобулины и казеин. Отфильтровывают через складчатый бумажный фильтр раствор альбуминов.

Растительный альбумин. 25 г пшеничной муки смешивают со 100 мл дистиллированной воды и смесь встряхивают в течение 1 ч с помощью встряхивателя. Взвесь муки центрифугируют и надосадочную жидкость фильтруют через складчатый фильтр. Отфильтрованный прозрачный раствор содержит преимущественно альбумин пшеничных зерен.

Белки грены тутового шелкопряда. 10 г грены тутового шелкопряда растирают в ступке, охлаждаемой смесью сухого льда и ацетона или жидким азотом. К гомогенату добавляют 10 мл *трис*-глицинового буфера (pH 8,6) и продолжают растирание еще 10 мин. Экстракт переносят в охлажденные центрифужные пробирки и центрифугируют при 15 000 *g* в рефрижераторной центрифуге ЦЛР-1 в течение 20 мин в интервале температур от —4 до 0°С. Надосадочная жидкость содержит около 0,75% белка. При разведении в 2—3 раза ее можно использовать также для постановки опыта по фракционированию белков тканей животных (с. 51).

ОБНАРУЖЕНИЕ В МОЛЕКУЛАХ БЕЛКОВ ПЕПТИДНЫХ СВЯЗЕЙ (БИУРЕТОВАЯ РЕАКЦИЯ)

К 1—2 мл разбавленного белка (см. предыдущую работу, с. 62) прибавляют двойной объем 30%-ного раствора гидроксида натрия, хорошо перемешивают и добавляют 2—3 капли 1%-ного раствора сульфата меди. Снова тщательно перемешивают. Развивается красно-фиолетовое окрашивание. При малом содержании белка чувствительность реакции можно повысить, наслаивая на раствор белка в щелочи 1 мл 1%-ного раствора сульфата меди. При стоянии на границе двух слоев появляется фиолетовое кольцо. Механизм биуретовой реакции рассмотрен ранее (с. 35).

НИНГИДРИНОВАЯ РЕАКЦИЯ

К 2—3 мл разбавленного раствора белка приливают 3—4 капли 1%-ного раствора нингидрина в 95%-ном растворе ацетона. Раствор перемешивают и ставят в водяную баню при 70°С на несколько минут. Развивается сине-фиолетовое окрашивание (с. 6).

КСАНТОПРОТЕИНОВАЯ РЕАКЦИЯ

К 1 мл раствора белка добавляют 5—6 капель концентрированной азотной кислоты до появления белого осадка или мути от свернувшегося белка. При нагревании раствор и осадок окра-

шиваются в ярко-желтый цвет. При этом осадок почти полностью растворяется.

Охлаждают смесь и осторожно добавляют к раствору, имеющему кислую реакцию, не взбалтывая, по каплям избыток концентрированного гидроксида аммония или щелочи до щелочной реакции. Выпадающий вначале осадок кислотного альбумината растворяется, и жидкость окрашивается в ярко-оранжевый цвет.

Ксантопротеиновая реакция происходит только при наличии в белках остатков ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина и триптофана). Желатина, например, не содержащая ароматических аминокислот, не дает ксантопротеиновой пробы. В результате реакции нитрования по радикалам ароматических аминокислот образуются желтоокрашенные нитросоединения. Изменение жёлтой окраски в оранжевую в щелочной среде обусловлено появлением хромофорной группы.

Рассмотрим в качестве примера механизм ксантопротеиновой реакции по радикалу тирозина:

$$\text{В цепь}-NH-\underset{\underset{C_6H_4OH}{|}}{\underset{CH_2}{\underset{|}{CH}}}-CO\sim\text{В цепь} + HONO_2 \longrightarrow \text{В цепь}-NH-\underset{\underset{C_6H_3(OH)NO_2}{|}}{\underset{CH_2}{\underset{|}{CH}}}-CO\sim\text{В цепь} + H_2O;$$

$$\text{В цепь}-NH-\underset{\underset{C_6H_3(OH)NO_2}{|}}{\underset{CH_2}{\underset{|}{CH}}}-CO\sim\text{В цепь} + NH_4OH \longrightarrow \text{В цепь}-NH-\underset{\underset{C_6H_3(=O)(=NO_2^-)}{|}}{\underset{CH_2}{\underset{|}{CH}}}-CO\sim\text{В цепь} + NH_4^+ + H_2O$$

РЕАКЦИЯ С ПИКРИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

К 2 мл разведенного раствора белка прибавляют 0,5 г карбоната натрия, добавляют 1 мл насыщенного водного раствора пикриновой кислоты, перемешивают и нагревают в пламени горелки несколько минут. Желтая окраска раствора постепенно переходит в красную вследствие восстановления пикриновой кислоты в пикраминовую:

$$C_6H_2(OH)(NO_2)_3 \xrightarrow{\text{Восстановление}} C_6H_2(OH)(NO_2)_2NH_2$$

Предполагают, что восстановление пикриновой кислоты в пикраминовую осуществляется за счет дикетопиперазиновых группировок, которые могут возникнуть вследствие конденсации аминокислот, высвобождающихся из белковой молекулы при кипячении в щелочной среде, а также за счет HS-групп белков. Вместе с тем восстановление пикриновой кислоты возможно аминосахарами, моносахаридами и другими соединениями, входящими в состав некоторых белков в качестве нормальных ингредиентов (известно, что углеводы обнаружены во многих белках, до сих пор считавшихся протеинами). Поэтому данная цветная реакция на белок мало специфична.

РЕАКЦИЯ САКАГУЧИ

Берут в пробирку 2—3 мл разбавленного раствора белка, добавляют 1 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и вслед за этим несколько капель 0,2%-ного спиртового раствора α-нафтола. Перемешивают, приливают 0,5 мл раствора гипобромита натрия и вновь перемешивают. Развивается оранжево-красное окрашивание. Появление окраски объясняется взаимодействием α-нафтола в присутствии окислителя с гуанидиновыми группировками радикалов аргинина, имеющимся в молекуле белка. Механизм этой реакции рассмотрен на странице 22.

РЕАКЦИЯ МИЛЛОНА

К 0,5—1 мл неразбавленного белка куриного яйца прибавляют двойной объем азотнортутного реактива Миллона. Белок свертывается под действием солей ртути и азотной кислоты, входящих в реактив, образуя сгусток белого цвета. При нагревании пробирки в пламени горелки осадок окрашивается в кирпично-красный цвет.

Реакцию Миллона дают все белки, содержащие в своем составе остаток тирозина. Химические процессы, происходящие при взаимодействии тирозина с реактивом Миллона, приводятся на странице 22. Белки, не содержащие тирозина (например, желатина, протамины и т. п.), реакции Миллона не дают.

РЕАКЦИЯ АДАМКЕВИЧА

Наливают в пробирку несколько капель неразбавленного белка и прибавляют 2 мл ледяной уксусной кислоты, к которой добавляют немного глиоксиловой кислоты. Смесь слегка нагревают до растворения образующегося осадка. Охлаждают пробирку со смесью, а затем, сильно наклонив ее, осторожно, по стенке приливают 1 мл концентрированной серной кислоты так, чтобы обе жидкости не смешались. При стоянии на границе двух жидкостей получается красно-фиолетовое кольцо.

Желатина не дает этой реакции, так как она не содержит аминокислоты триптофана, от присутствия которого зависит эта реакция. Окраска возникает за счет реакции триптофана с глиоксиловой кислотой, всегда присутствующей в уксусной кислоте в виде примеси.

Механизм данной реакции рассмотрен на странице 24. Небольшие количества меди повышают чувствительность ее.

РЕАКЦИЯ ВУАЗЕНЕ

К 2 мл разбавленного раствора белка в пробирке добавляют одну каплю 2,5%-ного раствора формальдегида. Смешивают и прибавляют 6 мл чистой концентрированной соляной кислоты (плотность не менее 1,175), после чего снова перемешивают. Через 10 мин прибавляют при взбалтывании 10 капель 0,5%-ного раствора нитрита натрия. Развивается интенсивное сине-фиолетовое окрашивание.

Реакция Вуазене также протекает только с теми белками, которые содержат в своем составе триптофан. Химизм ее аналогичен химизму реакции Гопкинса — Коле (с. 24); и в том, и в другом случае в конденсацию с триптофаном вступает формальдегид.

РЕАКЦИЯ ПАУЛИ

К 1 мл 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты в 5%-ном растворе соляной кислоты приливают 2 мл 0,5%-ного раствора нитрита натрия, сильно встряхивают и немедленно добавляют сначала 2 мл разбавленного раствора белка, а затем, после перемешивания содержимого пробирки, 6 мл 10%-ного раствора карбоната натрия. После смешивания растворов развивается вишнево-красное окрашивание.

Возникновение окраски обусловлено наличием в белковой молекуле остатков гистидина и тирозина. Их радикалы, взаимодействуя с диазобензолсульфоновой кислотой, дают начало соединениям, формула одного из которых приведена на странице 23. Там же рассмотрен механизм реакции между радикалом гистидина и диазобензолсульфоновой кислотой.

НИТРОПРУССИДНАЯ РЕАКЦИЯ

В пробирку берут 3 мл разбавленного раствора белка, приливают равный объем насыщенного раствора сульфата аммония и 2—3 капли 5%-ного раствора нитропруссида натрия. Затем раствор подщелачивают несколькими каплями крепкого раствора аммиака. Если в белке присутствует цистеин, то происходит реакция, в результате которой развивается пурпурное окрашивание.

РЕАКЦИЯ НА «СЛАБОСВЯЗАННУЮ СЕРУ»

В пробирку наливают 0,5—1,0 мл неразбавленного белка, добавляют двойной объем концентрированного раствора щелочи, кладут несколько «кипятильников» и кипятят смесь (*осторожно, жидкость может выбросить!*). При этом выделяется аммиак, который может быть обнаружен по запаху и по посинению влажной лакмусовой бумажки, поднесенной к отверстию пробирки (*не касаться стенки!*). Образующийся незначительный осадок растворяется при кипячении.

Горячую щелочную жидкость делят на 2 части: к первой приливают раствор плюмбита натрия, образуется желто-бурое или черное окрашивание. Ко второй — 2—3 капли свежеприготовленного разбавленного раствора нитропруссида натрия, получается красно-фиолетовое окрашивание.

Под действием щелочей белки подвергаются частичному гидролизу по пептидным связям, превращаясь в щелочные альбуминаты. Наряду с этим наблюдается отщепление части аминогрупп (реакция дезаминирования) в виде аммиака. При наличии в молекуле белка аминокислот, содержащих серу (цистина, цистеина), от этих аминокислот постепенно отщепляется также и сера в виде иона в степени окисления +2. Его образование можно обнаружить с помощью ионов тяжелых металлов, например ионов свинца, образующих с ионами серы черный нерастворимый сульфид свинца:

$$Pb(NO_3)_2 + 2NaOH \rightarrow Pb(OH)_2 + 2NaNO_3$$
$$Pb(OH)_2 + 2NaOH \rightarrow Na_2PbO_2 + 2H_2O$$
$$Na_2PbO_2 + H_2S \rightarrow PbS\downarrow + 2NaOH$$

Ион серы, образующийся из сероводорода в сильнощелочной среде, может быть открыт нитропруссидом натрия, являющимся реактивом на ион серы.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ

Для количественного определения белков применяют физические, химические и биологические методы.

Из физических методов простейшим кажется взвешивание чистого белка. Однако белки очень гигроскопичны, и полностью удалить из их состава воду столь трудно, что этот способ количественного определения белков применяют редко. Кроме того, выделить весь белок из препарата практически невозможно.

Наибольшее распространение из физических методов количественного определения белков получили три: рефрактометрический (по показателю преломления белковых растворов), спектрофотометрический (по поглощению в ультрафиолетовой области спектра) и полярографический (по кривым, показывающим зависимость между силой тока и напряжением, приложенным к

системе, содержащей белок). Пикнометрический метод (по плотности белковых растворов) употребляется редко.

Химические методы количественного определения белков разнообразны. Наиболее простым химическим методом определения белка является количественное определение общего или белкового (после осаждения белка и отделения его от растворимых азотсодержащих веществ) азота. Умножая величину процентного содержания общего азота на коэффициент 6,25 (среднее содержание азота в белках — 16%, отсюда 100 : 16 = 6,25), получают данные о содержании сырого протеина. Проделывая ту же операцию с величиной, характеризующей содержание белкового азота, получают данные о количестве белка. Эти способы условны, ибо не дают абсолютных результатов.

На том же принципе основаны два других метода химического определения белков: по содержанию металла и по содержанию той или иной аминокислоты. Например, в гемоглобине содержится 0,34% железа. Если в изучаемом на содержание гемоглобина препарате нет других железосодержащих соединений, то определение в препарате железа дает возможность рассчитать содержание гемоглобина. Аналогично рассуждают, если в составе препарата определено содержание какой-либо аминокислоты, доля которой в белке хорошо известна. Оба перечисленных метода применяются лишь в отдельных случаях.

Самым распространенным химическим методом количественного определения белков является колориметрический метод. Он основан на измерении интенсивности цветных реакций, развивающихся при взаимодействии белков с тем или иным специфическим реагентом (с. 63—66). Чтобы рассчитать концентрацию белка, в этом случае строят калибровочный график.

Биологические методы количественного определения белков применимы лишь к белкам, обладающим ферментативной и гормональной активностью. Измеряя степень биологической активности препарата, можно составить представление о содержании в нем белка, обладающего данной активностью. Этот метод тоже не дает абсолютных результатов.

РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Оборудование, реактивы. Рефрактометр; бумага фильтровальная; вата; палочки стеклянные; смесь спирта и эфира (1 : 1); сыворотка крови.

Коэффициентом рефракции (или показателем преломления) называют отношение синуса угла падения луча света к синусу угла его преломления (рис. 24). Коэффициент рефракции принято обозначать буквой n:

$$n = \frac{\sin\alpha}{\sin\beta}$$

Между показателем преломления (n) и концентрацией вещества в растворе для многих соединений характерна прямо пропорциональная зависимость. Пользуясь специальными таблицами, можно найти содержание вещества в растворе по его показателю преломления. Разработан подобный метод и для количественного определения белков. Он особенно удобен для определения концентрации белка в жидкостях биологического происхождения — сыворотке крови животных, гемолимфе насекомых и т. д.

Коэффициент преломления раствора белка или белоксодержащей жидкости биологического происхождения находят с помощью специального прибора—рефрактометра. Для этого используют рефрактометры с точностью отсчета 10^{-4}—10^{-5}, допускающие работу не с монохроматическим, а с белым светом и требующие для проведения определения несколько капель раствора (рис. 25). Применяют также более современные рефрактометры, например ИРФ-22 отечественного производства. Работают с рефрактометром следующим образом:

раскрывают камеру (*2*) с призмами, тщательно ополаскивают призмы водой, промокают фильтровальной бумагой и окончательно осушают, протирая призмы ватой, смоченной смесью спирта и эфира (1 : 1). Стеклянной палочкой наносят на нижнюю призму *2* капли дистиллированной воды и закрывают камеру. Устанавливают рефрактометр так, чтобы призмы его были ярко освещены или пря-

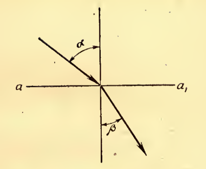


Рис. 24. Преломление луча света при переходе из одной среды в другую:

aa_1 — граница двух сред; α — угол падения; β — угол преломления.

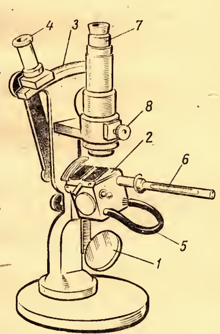


Рис. 25. Общий вид рефрактометра Аббе:

1 — зеркало; *2* — камера с призмами; *3* — шкала; *4* — лупа; *5* — соединительный шланг для термостатирования; *6* — термометр; *7* — окуляр; *8* — ахроматор.

мым светом, или пучком света, отраженным от зеркала (*1*). Об этом судят по степени освещенности видимого в окуляр (*7*) поля. Если граница тени окрашена и расплывчата, поворотом рукоятки ахроматора (*8*) добиваются четкости и бесцветности границы. Поворотом призм или окуляра рефрактометра подводят границу темного поля к перекрестку нитей окуляра. Делают отсчет по шкале. При температуре 20°С отсчет должен быть 1,333 (показатель преломления воды при 20°С). Это значит, что прибор установлен и работает правильно. После того как прибор установлен по воде, камеру с призмами раскрывают, воду удаляют фильтровальной бумагой и сушат призмы смесью спирта с эфиром. На нижнюю призму наносят прозрачную каплю сыворотки крови (получение сыворотки см. с. 49) и закрывают камеру. Делают отсчет, как описано выше. Настройку прибора сбивают и делают еще один отсчет. Эту операцию повторяют снова. Все три значения заносят в рабочий журнал и вычисляют среднюю величину. По ней, пользуясь специальной таблицей (см. приложение), находят процентное содержание белка в сыворотке крови. Найденное значение заносят в журнал.

По окончании работы смывают водой с призм прибора сыворотку, удаляют воду фильтровальной бумагой и осушают призмы спирто-эфирной смесью. На нижнюю призму накладывают кусочек фильтровальной бумаги и закрывают камеру. В таком состоянии прибор оставляют до следующего определения.

Если во время проведения отсчета температура не равна 20°С, то в полученное значение показателя преломления вносят поправку 0,0001 на каждый градус. В случае более низкой температуры поправку вычитают, более высокой — прибавляют.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ПО СОДЕРЖАНИЮ ОБЩЕГО И БЕЛКОВОГО АЗОТА

Оборудование, реактивы. Пробирка (0,5 × 3 см) для отвешивания вещества; трубка каучуковая диаметром 0,5 см; колбы Кьельдаля на 100 и 500 мл; стеклянные полые втулки для колб Кьельдаля; каплеуловитель (насадка Кьельдаля); холодильник стеклянный лабораторный с прямой трубкой; трубка с предохранительным шаром (пипетка Гемпеля); колба коническая на 250 мл; кипятильники; бюретки прямые с краном на 50 мл; воронка стеклянная; цилиндр мерный с носиком на 50 мл; серная кислота (конц.); сульфат меди; сульфат калия; гидроксид натрия (33%-ный); борная кислота (2,5%-ная); соляная кислота ($^1/_{14}$ н.); смешанный индикатор (см. приложение).

Как отмечено выше, приблизительное представление о содержании белков в препаратах биологического происхождения может дать определение общего азота. Более точные данные получают в результате определения белкового азота препаратов. Оба метода находят широкое применение для оценки качества кормов в животноводстве, при изучении переваривания кормов и усвоения азотсодержащих веществ сельскохозяйственными животными и т. п. В этих случаях содержание азота чаще всего определяют по методу Кьельдаля.

Определение общего азота по методу Кьельдаля

При определении общего азота органическое вещество сжигают с концентрированной серной кислотой (минерализация веществ). Органическое вещество распадается, окисляясь до углекислого газа и воды. Азот при этом превращается в аммиак, который образует с серной кислотой аммонийную соль. После сжигания аммонийную соль разлагают щелочью, а выделяющийся аммиак поглощают борной кислотой. Тетраборат аммония титруют раствором соляной кислоты и рассчитывают количество азота в навеске, подвергшейся сжиганию, а затем и во всем препарате.

Химические процессы при определении общего азота по Кьельдалю можно выразить уравнениями:

$$\text{азотсодержащее органическое соединение} + \underset{\text{конц.}}{H_2SO_4} \rightarrow (NH_4)_2SO_4 + CO_2 + H_2O$$

$$(NH_4)_2SO_4 + 2KOH \rightarrow K_2SO_4 + 2H_2O + 2NH_3$$

$$2NH_3 + 4H_3BO_3 \rightarrow (NH_4)_2B_4O_7 + 5H_2O$$

Для ускорения сжигания применяют катализаторы: пероксид водорода, ртуть, сульфат меди и др., а для повышения температуры сжигаемой смеси добавляют сульфат калия.

Вещество (сухой растительный или животный мелкоизмельченный материал) взвешивают на аналитических весах. В нем должно содержаться 20—40 мг азота. В случае растительного материала берут 0,3—0,5 г вещества, а животного — 0,1—0,2 г. Отвешивают вещество в маленькой пробирке ($0{,}5\times3$ см), которую затем вставляют в резиновую трубку нужного диаметра и пересыпают вещество в колбу Кьельдаля, выполняя эту операцию следующим образом: вводят пробирку с помощью надетой на нее трубки почти до основания перевернутой вверх дном колбы Кьельдаля и опрокидывают всю систему. После этого еще раз взвешивают пустую пробирку и по разности масс определяют массу вещества.

Сжигание проводят в колбе Кьельдаля, в которую приливают к веществу 10 мл серной кислоты. К смеси добавляют крупинку сульфата меди (катализатор) и 5 г сульфата калия (обеспечивает в дальнейшем повышение температуры сжигания вещества до оптимального значения). Перемешивают содержимое колбы (без встряхивания), ставят колбу на асбестированную сетку в наклонном положении и закрывают ее отверстие стеклянной полой втулкой. Сжигание вещества проводят под тягой. Нагревание сначала ведут на небольшом пламени. Вещество обугливается, вспенивается от выделяющихся газов, в том числе оксида серы (IV). Колбу при сильном вспенивании жидкости снимают с огня, не допуская высокого поднятия пены в колбе. Жидкость в колбе осторожно перемешивают и после оседания пены снова нагревают на сетке. После прекращения вспенивания можно усилить нагревание до слабого кипения жидкости. При сильном ки-

пении могут быть потери азота вследствие разложения сульфата аммония. Необходимо следить, чтобы горло колбы всегда оставалось холодным.

Сильное обугливание и вспенивание наблюдаются при сжигании веществ с большим содержанием углеводов, жиров, белков. Образцы, состоящие из молекул с короткой углеродной цепью, окисляются без образования углистой массы, а только с окрашиванием жидкости в темно-бурый или черный цвет. Необходимо следить за тем, чтобы на стенках колбы Кьельдаля не оставалось темных частиц. Их следует смыть горячей кислотой, придав колбе наклонное положение.

Нагревание продолжают до исчезновения бурой окраски и еще 1—2 ч после просветления жидкости. Затем колбу Кьельдаля плотно закрывают чистой резиновой пробкой.

Для отгонки аммиака следует собрать прибор (рис. 26), состоящий из перегонной колбы на 500 мл, соединенной с насадкой для улавливания капель; холодильника; трубки с шариком для предохранения от всасывания жидкости; приемной колбы на 250 мл, в которую перед началом перегонки вливают 50 мл 2,5%-ного раствора борной кислоты.

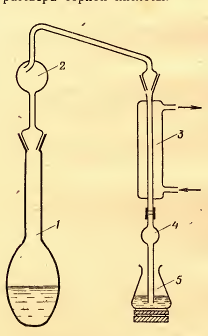


Рис. 26. Прибор для отгонки аммиака:

1 — перегонная колба Кьельдаля на 0,5 л; *2* — насадка Кьельдаля; *3* — холодильник Либиха; *4* — предохранительная пипетка; *5* — приемная колба.

В колбу Кьельдаля, где проводилось сжигание, после полного охлаждения приливают 20—30 мл воды, перемешивают и раствор количественно переносят в колбу Кьельдаля на 500 мл, ополаскивая колбу для сжигания 4—5 раз порциями воды по 20—25 мл, которые выливают в ту же колбу для отгонки. Общий объем жидкости должен составить приблизительно 150 мл. В колбу бросают несколько «кипятильников» и приливают столько 33%-ного раствора гидроксида натрия, сколько нужно для нейтрализации взятой для сжигания серной кислоты и создания сильнощелочной среды.

Для выяснения необходимого объема щелочи берут 1 мл серной кислоты, используемой для сжигания по Кьельдалю, разбавляют ее 15—20 мл воды, добавляют 1—2 капли фенолфталеина и из градуированной пипетки приливают по каплям

щелочь до нейтрализации кислоты. Рассчитывают объем щелочи на 10 мл кислоты и сверх этого добавляют 10 мл щелочи для создания сильнощелочной среды, которая необходима для разложения сульфата аммония. Щелочь вливают осторожно, по стенке наклоненной колбы, чтобы она, стекая на дно, не смешивалась с жидкостью, иначе неизбежны потери аммиака. После этого колбу закрывают резиновой пробкой с насадкой, ставят на сетку, осторожно перемешивают содержимое колбы и нагревают до кипения.

Выделяющийся аммиак через холодильник поступает в приемник с борной кислотой. Конец трубки с шариком должен быть погружен в кислоту. После того как основное количество аммиака будет отогнано, трубку вынимают из кислоты, давая жидкости свободно стекать с кончика предохранительной пипетки. Этот момент наступает, когда в приемник перешло приблизительно 30 мл дистиллята. Конец перегонки определяют с помощью лакмусовой бумаги, отсоединяя трубку с шариком от холодильника и испытывая реакцию стекающих капель жидкости из холодильника на лакмус. Обыкновенно перегонка заканчивается после отгонки примерно $^2/_3$ жидкости (около 110 мл). После окончания работы конец трубки с шариком и внутреннюю полость шара пипетки обмывают водой из промывалки.

Аммиак, поглощенный борной кислотой, образует соль — тетраборат аммония, которая, как соль слабой кислоты, нацело оттитровывается соляной кислотой. По количеству затраченной соляной кислоты судят о количестве аммиака. Избыток борной кислоты, как слабой кислоты, не влияет на изменение цвета сильнокислотного индикатора. Для титрования пользуются $^1/_{14}$ н. раствором соляной кислоты:

$$(NH_4)_2B_4O_7 + 2HCl \rightarrow 2NH_4Cl + H_2B_4O_7$$

Как видно из уравнения реакции, отношение NH_4^+-групп и молекул HCl равно 1 : 1. Следовательно, 1 мл $^1/_{14}$ н. раствора HCl, затраченный на титрование, соответствует тысячной доле $^1/_{28}$ *моль* азота, т. е. 1 мг азота.

В приемную колбу вносят 10—15 капель смешанного индикатора до ярко выраженной зеленой окраски и титруют из бюретки $^1/_{14}$ н. раствором соляной кислоты до изменения цвета в фиолетовый (промежуточная окраска — сероватого тона). Количество миллилитров затраченной соляной кислоты соответствует количеству миллиграммов азота в растворе.

При определении азота ставят контрольный опыт на реактивы, т. е. проводят со взятыми реактивами все операции, что и в опыте. Масса найденного азота в миллиграммах в контроле вычитают из такового в опыте. Исходя из полученных данных, рассчитывают процентное содержание азота во взятом для сжигания веществе. Умножая полученную цифру на 6,25, находят содержание в исследуемом препарате сырого протеина.

Определение белкового азота

Оборудование, реактивы. Шкаф сушильный; баня водяная; стаканы стеклянные лабораторные с носиком на 100 мл; палочки стеклянные; воронки стеклянные; фильтры бумажные безазотистые; высушенный растительный или животный материал; этиловый спирт (96%-ный); трихлоруксусная кислота (5%-ная и 10%-ная); приборы, посуда и реактивы, необходимые для определения общего азота (с. 70).

Отвешивают растительный (0,5 г) или животный (0,3 г) сухой материал на аналитических весах, помещают в химический стакан объемом 50 мл, смачивают несколькими каплями 96%-ного раствора этилового спирта и вливают 20 мл дистиллированной воды. Размешивают содержимое стеклянной палочкой, которую оставляют в стакане до конца экстракции небелкового азота. Стакан ставят на кипящую водяную баню и, изредка перемешивая, нагревают в течение 30 мин. Растворимые в воде азотистые соединения переходят при этом в экстракт. Охлаждают до комнатной температуры, приливают равный объем 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ), перемешивают и оставляют на 2 ч. ТХУ осаждает из экстракта белки, оставляя в нем азотсодержащие небелковые соединения. Осадок отфильтровывают на воронке диаметром 5 см через безазотистый плотный фильтр, промывая трижды 5%-ным раствором ТХУ. Фильтрат отбрасывают, а осадок вместе с фильтром слегка подсушивают в сушильном шкафу при температуре 60—70°С. Извлекают фильтр из воронки, складывают его и помещают в колбу Кьельдаля, куда приливают 10 мл концентрированной серной кислоты, бросают кристаллик медного купороса и всыпают 5 г безводного сульфата натрия или калия.

Сжигание фильтра с осадком и определение азота проводят так же, как в предыдущей работе (с. 71—72).

Параллельно с опытом ставят контроль, в котором для озоления берут фильтр того же размера и качества, как для отделения осадка, и все реактивы. Найденную в контрольном опыте массу азота в миллиграммах вычитают из такового, обнаруженного в опыте. Затем рассчитывают процентное содержание белкового азота. Умножая эту цифру на 6,25, получают данные о содержании белка в препарате. При этом следует иметь в виду, что это не чистый белок, так как некоторая часть учтенного азота принадлежит нуклеиновым кислотам, липидам и другим соединениям, не извлекаемым из препарата водой. Однако определение белкового азота дает более точное представление о содержании белка в препарате, нежели определение сырого протеина.

Конечная концентрация ТХУ, необходимая для полного осаждения из экстракта белков, различна для разных объектов. Поэтому предварительно проводят в нескольких пробах осаждение белков из экстракта при конечной концентрации трихлоруксусной кислоты от 2,5 до 10%. На основании полученных данных выбирают оптимальную для осаждения белков при работе с данным объектом концентрацию ТХУ.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА ПО БИУРЕТОВОЙ РЕАКЦИИ

Биуретовая реакция (с. 35 и 63) белков не отличается высокой чувствительностью. Поэтому она применяется в тех случаях, когда содержание белка в исследуемом образце достаточно велико (не ниже нескольких миллиграммов на миллилитр).

Оборудованне, реактнвы. Фотоэлектроколориметр; пробнрки стеклянные хнмические; пипетки градунрованные на 1,2 и 10 мл; гидроксид натрия (10%-ный), не содержащий примеси карбонатов (готовится разведеннем 75%-ного раствора гндрокснда натрня, в котором карбонаты нерастворимы, прокнпяченной днстнллнрованной водой, свободной от CO_2); хлорнд иатрия (1%-ный); сульфат медн; сегнетова соль; сыворотка крови; гемолимфа насекомых; экстракты ткаиевых белков.

Готовят три серии стандартных растворов, содержащих от 1 до 10 мг белка в 1 мл раствора. Вместо кристаллического белка для этого может быть взята сыворотка крови или гемолимфа, в которой предварительно определено содержание белка рефрактометрическим методом. Разведение до необходимых концентраций белка при приготовлении серии растворов осуществляют 1%-ным раствором хлорида натрия.

Готовят биуретовый реактив, растворяя последовательно в мерной колбе на 250 мл 0,375 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ и 1,5 г сегнетовой соли ($KOOC—CHOH—CHOH—COONa \cdot 4H_2O$) в 150 мл воды. Приливают медленно при постоянном перемешивании 75 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и доводят содержимое до 250 мл водой. Биуретовый реактив не подлежит длительному хранению в стеклянной посуде.

Берут из первой серии по 1 мл каждого стандартного раствора белка в отдельные пробирки и приливают в каждую из них по 8 мл биуретового реактива. Оставляют на 30 мин при комнатной температуре и фотометрируют в кюветах (длина 1 см) при 540 нм против контроля (вместо раствора белка берут 1 мл дистиллированной воды). Определение повторяют трижды, беря каждый раз новую серию стандартных растворов белка. По полученным значениям экстинкций строят калибровочную кривую.

1 мл сыворотки или 1 мл гемолимфы разводят 1%-ным раствором хлорида натрия в 10 раз. К 1 мл разведенного раствора, взятому в пробирку, приливают 8 мл биуретового реактива, перемешивают и оставляют на 30 мин. Фотометрируют против контроля при 540 нм в кювете (длина 1 см). По калибровочному графику определяют содержание белка в пробе и выражают его далее с учетом разведения в процентах в целом препарате.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА ПО МЕТОДУ ЛОУРИ

Оборудованне, реактнвы. Фотоэлектроколориметр; цнлиндры мериые с носнком иа 50 н 10 мл; пипетки градуированные на 1,5 и 10 мл; набор пробнрок стекляииых химическнх; раствор А: карбоиат иатрня (2%-иый) в гидроксиде

натрия (0,1 н.); раствор В: медный купорос (0,5%-ный) в цитрате натрия (1%-ном) или в тартрате калия или натрия (3,33%-ном); раствор С: реактив Фолина (см. приложение); препарат белка.

Среди методов, основанных на количественном определении белков посредством цветных реакций, наиболее распространен и обладает высокой чувствительностью метод Лоури. Как и все другие основанные на цветных реакциях методы, он дает абсолютные данные о содержании белков только в том случае, если калибровочный график (см. ниже) построен по тому же самому белку, определение которого ведут при посредстве цветной реакции.

Метод Лоури основан на измерении интенсивности окраски раствора, в котором осуществляется цветная реакция на белок (реакция Фолина) с тирозиновым и цистеиновым радикалами белковой молекулы, состоящая в восстановлении смеси фосфорно-вольфрамовой и фосфорно-молибденовой кислот (реактив Фолина) с образованием комплексного соединения синего цвета. Указанной реакции восстановления способствуют комплексные соединения меди, возникшие при взаимодействии белка со щелочным раствором медного купороса. Хотя реакция Фолина не очень специфична, но зато весьма чувствительна. Поэтому метод Лоури позволяет вести определения белков в сильно разбавленных растворах, где количество их выражается всего лишь десятками микрограммов и, как правило, применяется для учета белков в элюатах с колонок при фракционировании на ионообменных смолах и сефадексах.

Перед проведением определения смешивают 49 мл раствора А с 1 мл раствора В. К 1 мл исследуемого белкового раствора, содержащего от 10 до 100 мкг белка, добавляют 4 мл смеси растворов А и В. Встряхивают и оставляют на 10 мин при комнатной температуре. Затем быстро приливают из пипетки 0,4 мл реактива Фолина, энергично перемешивают и оставляют на 30—90 мин для развития окраски. При этом желтая окраска раствора постепенно переходит в синюю. Оптическую плотность раствора измеряют на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при 750 нм в кюветах с толщиной слоя в 1 см.

Содержание белка в испытуемой пробе устанавливают по калибровочной кривой, построенной заранее по раствору какого-либо чистого белка точно известной концентрации. Лучше всего использовать раствор того белка или смеси белков, определение которых ведут по методу Лоури. Для этого готовят серию растворов белка (кристаллического яичного или сывороточного альбумина, казеина и т. п., а еще лучше белка или смеси белков, определение которых предполагают осуществить) с содержанием от 20 до 400 мкг в 1 мл. Естественно, что концентрацию белков в сложных белковых смесях, используемых для приготовления стандартных растворов, определяют каким-либо иным методом, например рефрактометрически в случае сыворотки крови или

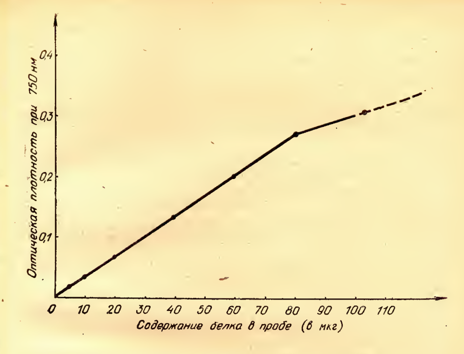


Рис. 27. Калибровочная кривая для определения белка по методу Лоури. В качестве эталона использован кристаллический сывороточный альбумин быка.

гемолимфы беспозвоночных (см. с. 68). Белки растворяют в 0,1 н. растворе гидроксида натрия. Серию растворов готовят путем разведения исходного концентрированного раствора белка (400 мкг в 1 мл) до необходимых значений. С каждым из указанных растворов проделывают не менее пяти раз реакцию Лоури, применяя те же объемы реагентов, что указаны выше (всего 5,4 мл). По полученным данным строят график — калибровочную кривую (рис. 27).

Если теперь соединить горизонтальной линией какое-то значение экстинкции на шкале ординат (на ней отложены значения оптической плотности) с калибровочной кривой и из точки пересечения опустить на ось абсцисс (на ней отложена концентрация белка в микрограммах в пробе) перпендикуляр, то точка пересечения последнего с осью абсцисс укажет содержание белка в микрограммах в пробе. Вслед за этим делают пересчет содержания белка на 100 мл исследуемого раствора или другую размерность.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА ПО МЕТОДУ БРЕДФОРД

Оборудование, реактивы. Спектрофотометр СФ-4а или СФ-16; набор пробирок стеклянных химических; пипетки: на 0,1 мл (2 шт.), 5 мл и 50 мл; мерные колбы: на 1 л и на 0,1 л (5 шт.), кумасси бриллиантовый голубой (Q-250); этанол (95%-ный); фосфорная кислота (85%-ная).

Приготовление реактива Бредфорд. 100 мг кумасси бриллиантового голубого ($Q = 250$) растворяют в 50 мл 95%-ного этанола и добавляют 100 мл 85%-ного раствора фосфорной кислоты. Полученный раствор доводят до 1 л бидистиллированной водой. Реактив Бредфорд пригоден в течение 10 дней при хранении в темноте.

Построение калибровочной кривой. 160 мл бычьего сывороточного альбумина отвешивают на аналитических весах и растворяют в бидистиллированной воде в мерной колбе на 100 мл. Концентрация полученного исходного раствора белка — 1600 мкг/мл. Путем разбавления исходного раствора каждый раз вдвое (50 мл предыдущего раствора пипеткой переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят бидистиллированной водой до метки) получают серию растворов белка с концентрациями от 100 до 1600 мкг/мл (всего 5 растворов, включая исходный). С полученными растворами бычьего сывороточного альбумина осуществляют процедуру, приведенную ниже. Все операции повторяют трижды, используя каждый раз новые серии растворов бычьего сывороточного альбумина, приготовленные независимо друг от друга.

Калибровочную кривую строят, откладывая значения экстинкций при 595 нм по оси ординат, а количество белка в пробе — по оси абсцисс.

Ход определения. 0,1 мл исследуемого раствора, содержащего от 100 до 1600 мкг белка в объеме 1 мл, микропипеткой вносят в пробирку и добавляют 5 мл реактива Бредфорд. По перемешивании раствор спектрофотометрируют при 595 нм (не ранее, чем через 2 мин, и не позже 1 ч) против контроля, содержащего 0,1 мл буфера, на котором приготовлен исследуемый раствор белка и 5 мл реактива.

Количество белка в пробе определяют по калибровочной кривой (рис. 28).

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ НА ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММАХ

Оборудование, реактивы. Микрофотометр МФ-4; фотоэлектроколориметр; ножницы; пробирки с притертыми пробками; гидроксид натрия (0,1 н.).

Только в случае оптически прозрачного полиакриламидного геля метод определения белковых фракций прямо на электрофореграммах дает вполне удовлетворительные результаты и исполь-

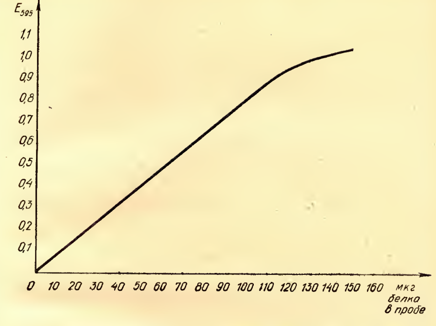


Рис. 28. Калибровочная кривая для определения белка по методу Бредфорд.

зуется во многих лабораториях. Что касается определения белковых фракций на бумажных электрофореграммах, то оно возможно лишь после элюции красителя. Однако сродство различных белковых фракций к красителю, в том числе и к амидошварцу 10В, варьирует в весьма широких пределах, вследствие чего данные, полученные по количественному содержанию той или иной фракции, условны.

Количественное определение белковых фракций на бумажных электрофореграммах

Для проведения работы используют электрофореграмму, полученную в предыдущем опыте (с. 51). Окрашенные участки электрофореграммы, соответствующие каждой отдельной белковой фракции, вырезают, измельчают ножницами на кусочки размером в несколько квадратных миллиметров и помещают в пробирки с притертыми пробками раздельно для каждого белка. Одновременно вырезают участок электрофореграммы, не содержащий белка, примерно такой же площади, как и окрашенные зоны, измельчают его и тоже помещают в пробирку. Во все пробирки приливают по 5 мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия. После 30 мин стояния при комнатной температуре (с периодическим встряхива-

нием) амидошварц 10В полностью переходит в раствор. Элюаты фотометрируют в кюветах (длина 1 см) на ФЭК-М или ФЭК-Н-57 с зеленым светофильтром против элюатов с контрольного участка электрофореграммы. Относительное процентное содержание отдельных белковых фракций рассчитывают как доли их экстинкций в общей фотометрической плотности всех фракций. Зная общее содержание белка в нанесенном на электрофореграмму объеме раствора, рассчитывают абсолютное содержание каждой фракции в анализируемом препарате.

Количественное определение белковых фракций на колонках полиакриламидного геля

Гелевую колонку, содержащую окрашенные амидошварцем белковые фракции (с. 58), помещают в стеклянную трубку, заливают смесью метанола, уксусной кислоты и воды (10 : 1 : 30), закрывают, вытесняя пробкой растворитель, так, чтобы не осталось пузырька воздуха, и устанавливают горизонтально на подвижный столик МФ-4. Регулируя ширину щели и степень освещенности, добиваются такой чувствительности прибора, чтобы обеспечить запись каждой фракции в виде пика. Хорошие результаты получаются, если стандартный прибор МФ-4 оборудован дополнительно автоматическим самописцем и интегратором, выдающим данные о площади пиков. Последние можно также рассчитать по формуле $S = a(\lg h : 2)$, где h — высота пика и a — основание его. Необходимые данные для расчетов можно получить также гравиметрическим методом. Для этого полученную кривую переносят на лист очень ровной, плотной и толстой бумаги. Каждый пик вырезают и взвешивают на аналитических весах.

Массу (площадь) каждого пика выражают в процентах от суммарной массы (площади) всех пиков, что равноценно относительному содержанию белковых фракций в той части общего белка препарата, которая вошла в нижний гель и подверглась электрофоретическому фракционированию. Данные об абсолютном содержании белковых фракций на колонке этим методом могут быть получены только в том случае, если параллельно ставится специальный опыт по выяснению того, сколько белка вошло в нижний гель из общего его количества, нанесенного на зону старта.

СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА БЕЛКОВ

РЕАКЦИИ ОСАЖДЕНИЯ БЕЛКОВ

В состав белков входят разнообразные аминокислотные радикалы (см. учебник, с. 47—51), поэтому белки вступают во взаимодействие со многими соединениями (кислотами, ионами ме-

таллов, спиртами и т. п.), а также конкурируют с ними за молекулы растворителя (воды). Во многих случаях результатом указанных процессов является выпадение белков в осадок.

Для проведения реакций осаждения белков пользуются растворами белков, приготовленными ранее (с. 62).

Оборудование, реактивы. Фильтры бумажные; растворы белков (с. 62); воронка стеклянная; набор пробирок стеклянных химических; сульфат аммония (кристалл. и насыщ.); уксусная кислота (1%-ная и 10%-ная); хлорид натрия (насыщ.); гидроксид натрия (10%-ный); азотная, соляная, серная и уксусная кислоты (конц.); трихлоруксусная кислота (5%-ная); сульфосалициловая кислота (20%-ная); сульфат меди (5%-ный); ацетат свинца (5%-ный); пикриновая кислота (насыщ.); таннин (10%-ный); раствор иодида ртути в иодиде калия (см. приложение); соляная кислота (5%-ная); гексацианo-(III)-феррат калия (5%-ный); фенол (насыщ.); формалин; этиловый спирт; вольфрамат натрия (10%-ный); серная кислота (0,66 н.).

Высаливание белков сульфатом аммония

Наливают в пробирки 1—1,5 мл раствора белка, добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония и слегка встряхивают смесь. Появляется муть от выпадающего осадка глобулинов.

Мутную жидкость фильтруют через сухой складчатый фильтр. Часть прозрачного фильтрата нагревают до кипения и наблюдают свертывание альбуминов, находящихся в растворе. К другой части фильтрата добавляют при перемешивании избыток сульфата аммония в порошке до прекращения его растворения. Появляется муть или хлопья выпадающего в осадок альбумина (сравнить с исходным фильтратом). Осаждение белков солями является обратимым процессом, и при добавлении воды белки снова растворяются.

В водном растворе белков их частицы заряжены и гидратированы, что обусловливает устойчивость белковых растворов. Но при высокой концентрации солей, ионы которых тоже гидратированы, происходит разрушение водных оболочек белковых молекул и снимается заряд с белковой молекулы адсорбирующимися на ней ионами соли. В результате этих двух процессов белковые растворы теряют устойчивость, частицы белка слипаются друг с другом, укрупняются и, наконец, выпадают в осадок.

Использованный в опыте сульфат аммония обладает резко выраженной высаливающей способностью и осаждает белки в нейтральной среде, а еще лучше в слабокислой среде. Другие соли, например хлорид натрия, вызывают полное осаждение белков только при подкислении раствора белка.

Из приведенного опыта следует, что для высаливания различных белков требуется разная концентрация одних и тех же солей. Следовательно, белки можно высаливать фракционно;

действительно, глобулины выпадают уже при полунасыщении растворов сульфатом аммония, а альбумины выпадают только при полном насыщении.

Свертывание белков при нагревании

В пять пробирок наливают по 2 мл раствора белка.

а) Нагревают содержимое первой пробирки. Осадок белка появляется еще до того, как жидкость закипит.

б) Добавляют во вторую пробирку одну каплю 1%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают. Хлопьевидный осадок белка выпадает скорее и полнее вследствие того, что в результате подкисления pH раствора приблизился к изоэлектрической точке белка.

в) Добавляют в третью пробирку около 0,5 мл 10%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают. Осадок белка не образуется даже при кипячении.

г) Добавляют в четвертую пробирку около 0,5 мл 10%-ного раствора уксусной кислоты, несколько капель насыщенного раствора хлорида натрия и нагревают. Образуется осадок белка.

д) Добавляют в пятую пробирку около 0,5 мл раствора гидроксида натрия и нагревают. Осадок белка не образуется даже при кипячении.

Выпадение белков в осадок при нагревании — свертывание — характерно почти для всех белков (исключение составляет желатина, не свертывающаяся при нагревании). Особенно легко и более полно происходит осаждение белка в слабокислой среде, вблизи от изоэлектрической точки (п. *б*). В нейтральной и сильнокислой средах (п. *в*) осаждение белков идет значительно хуже, а в щелочной среде вовсе не наблюдается (п. *д*).

Белки, как амфотерные электролиты, могут диссоциировать как кислоты и как основания. Условно молекулу белка с равным количеством аминных и карбоксильных групп можно изобразить так:

$COOH$
NH_2

В водной среде, особенно вблизи изоэлектрической точки, молекулы белка представлены в виде нейтрального биполярного иона:

COO^-
$\overset{+}{N}H_3$

В кислой среде подавляется диссоциация белка по карбоксильным группам, и молекула белка заряжается положительно (белок находится в растворе даже при кипячении, п. *в*).

$$\text{Белок}\begin{matrix}COO^- \\ \overset{+}{N}H_3\end{matrix} + H^+ \rightleftharpoons \text{Белок}\begin{matrix}COOH \\ \overset{+}{N}H_3\end{matrix}$$

В щелочной среде понижается диссоциация белка по радикалам диаминокислот, и молекулы его приобретают отрицательный заряд, вследствие чего остаются в растворе даже при нагревании до кипения (п. *д*).

$$\text{Белок}\begin{matrix}COO^- \\ \overset{+}{N}H_3\end{matrix} + \overline{O}H \rightleftharpoons \text{Белок}\begin{matrix}COO^- \\ NH_2\end{matrix} + H_2O$$

Добавление к раствору белка нейтральных солей (хлорида натрия, сульфата аммония) облегчает и ускоряет свертывание белков при кипячении (п. *г*) вследствие наступающего дегидратирования белковых частиц. Но есть вещества, стабилизирующие белки, — полисахариды, сахара, альдегиды и др.

В отличие от осаждения солями свертывание белков при нагревании — денатурация белков — необратимо.

Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами

В три сухие пробирки наливают по 1—2 мл концентрированной азотной, серной и соляной кислот. Затем, наклонив каждую пробирку, осторожно по стенке приливают в нее из пипетки по 0,5 мл исследуемого раствора белка так, чтобы он не смешивался с кислотой. В месте соприкосновения двух жидкостей появляется белый аморфный осадок белка. При встряхивании осадок, выпавший при действии азотной кислоты, увеличивается, а осадки, выпавшие при действии соляной и серной кислот, растворяются в их избытке.

Желатина не осаждается минеральными кислотами.

Концентрированные минеральные кислоты вызывают необратимое осаждение белков. Это связано как с дегидратацией белковых молекул, так и с денатурацией белка.

Осаждение белков органическими кислотами

В две пробирки наливают по 2—3 мл раствора белка и добавляют в одну из них несколько капель 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, в другую — несколько капель 20%-ного раствора сульфосалициловой кислоты. В обоих случаях наблюдается выпадение осадка белка.

Сульфосалициловая и трихлоруксусная кислоты являются чувствительными и специфическими реактивами иа белок. Трихлоруксусиая кислота осаждает только белки и не осаждает продукты распада белка и амииокислоты, поэтому ею пользуются часто для полиого удаления белков из биологических жидкостей (например, сыворотки крови). В этих условиях продукты распада белков остаются в растворе.

Осаждение белков солями тяжелых металлов

В две пробирки наливают 1—1,5 мл исследуемого раствора белка и медлеиио, по каплям при встряхиваиии прибавляют в одиу из иих раствор сульфата меди, а в другую — раствор ацетата свиица. Выпадает хлопьевидиый осадок вследствие образоваиия малорастворимого солеобразного соедииения (с солью меди — голубого цвета, с солью свиица — белого цвета). При избытке реактива осадок сиова растворяется.

Соли тяжелых металлов (Hg, Ag, Cu, Pb и др.) вызывают иеобратимое осаждеиие белков, образуя с ними иерастворимые в воде соедииеиия. Поэтому белки примеияют в качестве противоядия при отравлеиии, например, ртутиыми солями (сулема). Но иекоторые из таких осадков (иапример, с солями меди, свиица, циика) растворяются в избытке осадителя вследствие адсорбции иоиов поверхностью белковых частиц: в результате этого белковые частицы приобретают заряд и виовь растворяются. Раствореиие осадков деиатурированиых белков в избытке солей тяжелых металлов называется адсорбциоииой пептизацией.

Осаждение белков фенолом и формалином

В две пробирки, содержащие по 1—2 мл раствора белка, добавляют: в первую — равиый объем иасыщенного водиого раствора фенола, а во вторую — равный объем формалина. В обеих пробирках выпадает осадок белка. От действия феиола осадок выпадает быстрее.

Осаждение белков спиртом

В пробирку иаливают 1—1,5 мл раствора белка и добавляют немного кристаллического хлорида иатрия. Приливают постепенно туда же 5—6 мл этилового спирта. Выпадает хлопьевидиый осадок белка вследствие дегидратации белковых молекул при добавлеиии спирта.

Осаждение белков вольфраматом натрия

К 3 мл раствора белка прибавляют 0,5 мл 0,66 н. раствора серной кислоты и после перемешивания — 0,5 мл 10%-ного раствора вольфрамата натрия. Выпадает осадок. Вольфрамат иат-

рия — один из лучших осадителей белков. Его часто применяют в лабораторной практике для депротеинизации биологических жидкостей и экстрактов. Однако он осаждает также некоторое количество диаминокислот.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ БЕЛКОВ МЕТОДОМ ГЕЛЬФИЛЬТРАЦИИ ЧЕРЕЗ СЕФАДЕКС

Работу по определению относительной молекулярной массы белков при посредстве фильтрации через гель сефадекса целесообразно совместить с их фракционированием этим методом, что значительно упрощает нахождение свободного объема (V_0) колонки, так как в сложной природной белковой смеси всегда присутствует компонент, не проникающий в поры молекулярного сита и выходящий из колонки с первыми порциями элюата.

Установлено, что соотношение объема элюента, необходимого для выноса исследуемого белка из колонки ($V_э$ — объем элюента), и объема элюата, размещающегося в свободном (не занятом гранулами сефадекса), пространстве колонки (V_0—свободный объем), обратно пропорционально величине относительной молекулярной массы белка. Данную закономерность иллюстрирует рисунок 29.

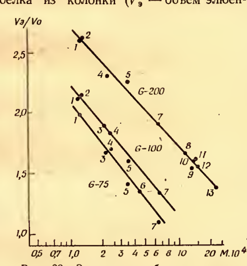


Рис. 29. Зависимость объема выхода от относительной молекулярной массы белков (по Г. Детерману):

1 — цнтохром «С» ($M = 13\ 000$); *2* — рибонуклеаза ($M = 13\ 600$); *3* — α-химотрипсин ($M = 22\ 500$); *4* — химотрнпснн ($M = 24\ 000$); *5* — пепсии ($M = 35\ 000$); *6* — яичиый альбумин ($M = 45\ 000$); *7* — сывороточный альбумнн быка ($M = 67\ 000$); *8* — глицеральдегндфосфатдегидрогеиаза ($M = 117\ 000$); *9* — сывороточный альбумии быка (димер, $M = 134\ 000$); *10* — альдолаза дрожжей ($M = 147\ 000$); *11* — γ-глобулнн человека ($M = 140\ 000$); *12* — алкогольдегидрогеназа дрожжей ($M = 150\ 000$); *13* — каталаза ($M = 230\ 000$).

Рассмотрим конкретный пример расчета относительной молекулярной массы белков на основании данных, полученных ранее при фракционировании белков гемолимфы тутового шелкопряда фильтрованием через гель сефадекса G-75 (с. 40—43). Из рисунка 14 следует, что свободный объем колонки равен 36 фракциям, по 5 мл каждая, т. е. (36 × 5) 180 мл. Эта величина соответствует экспериментально установленному

правилу, согласно которому свободный объем колонок с сефадексом составляет около 40% общего объема геля. Несомненно, что первый пик, центральная часть которого выходит из колонки в пробу № 36 (рис. 14), представлен белком с большой относительной молекулярной массой, не проникающим в зерна сефадекса G-75. В следующем, втором пике содержится не менее четырех белков, выходящих соответственно в 52, 58, 62 и 66 фракциях, т. е. в объемах элюата 260, 290, 310 и 330 мл соответственно.

Их относительные молекулярные массы рассчитывают по эмпирической формуле для сефадекса G-75:

$$\lg M_r = 5{,}624 - 0{,}752\,\frac{V_э}{V_0}$$

Подставляя значения $V_э$ и V_0 для перечисленных белков в эту формулу, находим величины логарифмов относительной молекулярной массы для каждого из них, а по ним — относительные молекулярные массы. В рассматриваемом примере эти данные таковы:

$$\lg M_{r_1} = 5{,}624 - 0{,}752\frac{260}{180} = 4{,}538; \quad M_{r_1} = 34\ 500$$

$$\lg M_{r_2} = 5{,}624 - 0{,}752\frac{290}{180} = 4{,}413; \quad M_{r_2} = 25\ 800$$

$$\lg M_{r_3} = 5{,}624 - 0{,}752\frac{310}{180} = 4{,}329; \quad M_{r_3} = 21\ 400$$

$$\lg M_{r_4} = 5{,}624 - 0{,}752\frac{330}{180} = 4{,}246; \quad M_{r_4} = 17\ 600$$

Дальнейший расчет, проведенный для третьего и четвертого пиков, убеждает в том, что они представлены пептидным материалом с относительной молекулярной массой от 2790 до 2120.

К аналогичным относительным молекулярным массам белков второго пика приходят при вычислении их по калибровочной кривой для сефадекса G-75 (рис. 29). Отношениям $V_э : V_0$, равным 1,44; 1,61; 1,72 и 1,83, соответствуют $M_{r_1} = 34\ 000$; $M_{r_2} = 26\ 000$; $M_{r_3} = 20\ 000$ и $M_{r_4} = 17\ 000$. Отношения $V_э : V_0$ для третьего (2,89) и четвертого (3,06) пиков лежат вне пределов калибровочной кривой и соответствуют пептидам.

Если необходимо с помощью сефадекса определить относительную молекулярную массу выделенного индивидуального белка, то достаточно измерить в соответствии с ранее приведенной прописью (с. 41—43) объем элюента, необходимый для его выноса из колонки ($V_э$). Пользуясь 40%-ной квотой объема геля для вычисления свободного объема колонки (V_0), рассчитывают по формуле значение логарифма M_r. При работе с сефадексами G-100 и G-200 используют формулы:

$$G\text{-}100 \quad \lg M_r = 5{,}941 - 0{,}847 \frac{V_э}{V_0}$$

$$G\text{-}200 \quad \lg M_r = 6{,}698 - 0{,}987 \frac{V_э}{V_0}$$

Более точные результаты получают при определении V_0 по специальному индикатору — голубому декстрану, имеющему относительную молекулярную массу в несколько миллионов. Однако это редкий реактив, и вместо него можно использовать гомогенные белки, отличающиеся высокой относительной молекулярной массой, как, например, каталаза (M_r = 252 000), пируваткиназа (M_r = 230 000), ксантиноксидаза (M_r = 320 000) и др.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ ДИССОЦИИРОВАННЫХ БЕЛКОВ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ (В ПРИСУТСТВИИ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ)

Использование эффекта молекулярного сита полиакриламидных гелей (см. учебник, с. 34—35) в сочетании с электрофорезом дает надежный метод для установления относительной молекулярной массы белков. Принцип метода сходен с тем, что приведен в предыдущей работе при рассмотрении процедуры определения относительной молекулярной массы белков посредством гельфильтрации через сефадекс.

При использовании электрофореза в полиакриламидном геле для определения относительной молекулярной массы белков очень важно соблюдать правильное соотношение между величиной пор и размером белковых частиц. Если диаметр частиц будет больше размера пор, то молекулы белка не смогут войти в гель; наоборот, если концентрация геля будет невелика и размер его пор будет значительно превышать диаметр белковых молекул, то последние практически не станут задерживаться гранулами полиакриламида. И в том и в другом случае эффект молекулярного сита будет утрачен и движение белковых частиц примет характер движения их при свободном электрофорезе.

Кроме размера, некоторое значение при определении относительной молекулярной массы белков рассматриваемым методом имеет форма белковых молекул. Только в том случае, когда белковые молекулы имеют сферическую форму, их поведение во время электрофореза будет прямо зависеть от величины их относительной молекулярной массы. Для достижения этой цели белки обрабатывают диссоциирующим раствором, содержащим додецилсульфат натрия (СДС) или мочевину и β-меркаптоэтанол. При этом происходит разрушение четвертичной и видоизменение третичной структуры белковой молекулы, т. е. мультимеры диссоциируют до мономеров, а в результате ослабления гидрофобных взаимодействий и разрушения водородных и дисульфидных связей в последних поли-

пептидные цепи принимают конформацию статически беспорядочного клубка. β-Меркаптоэтанол при этом используется для восстановления дисульфидных связей. В то же время экспериментально доказано, что СДС, как детергент анионного типа, изменяет заряд белковой молекулы. При наличии СДС в среде белки движутся к аноду, что вызвано связыванием примерно 70 молекул СДС с каждой белковой молекулой. В результате происходит перезарядка белковых молекул за счет анионных групп СДС. Но все же электрофоретическая подвижность комплекса СДС-белок в очень малой степени зависит от заряда белковой молекулы и в гораздо большей — от эффекта молекулярного сита, т. е. движение «развернутой» детергентом белковой молекулы в полиакриламидном геле почти полностью определяется величиной ее относительной молекулярной массы. Зависимость между значением молекулярной массы и степенью электрофоретической подвижности белка выражают графически. Возможно построение нескольких графических зависимостей. По оси ординат откладывают $\lg M_r$, а по оси абсцисс — в одном случае — значение логарифма расстояния в миллиметрах, пройденного белком в геле ($\lg x$), в другом — относительную электрофоретическую подвижность (ОЭП), рассчитанную по отношению к какому-либо маркеру с известной относительной молекулярной массой. В третьем случае по оси абсцисс откладывают логарифм коэффициента торможения ($\lg f$), который представляет отношение подвижности белка в геле одной плотности к подвижности его в геле другой плотности $\left(f = \frac{x_1}{x_2}\right)$. В данной работе использована первая графическая зависимость. Важно иметь в виду, что в гелях разной концентрации она характеризуется различными интервалами определяемой относительной молекулярной массы: для 5%-ного геля — от 20 000 до 350 000, для 10 %-ного — от 10 000 до 100 000 и для 15%-ного — от 10 000 до 60 000.

Оборудование, реактивы. Прибор для вертикального диск-электрофореза (рис. 21); универсальный источник питания; термостат на 37°С; баллон с азотом; мешалка магнитная; эксикатор с краном (вакуумный); сульфосалициловая кислота (20%-ная); красители — кумасси голубой, бромфеноловый синий; додецилсульфат натрия (СДС); β-меркаптоэтанол; препарат испытуемого белка (им может быть яичный альбумин, но в этом случае его исключают из числа белков, используемых в качестве стандарта для построения калибровочной кривой); сывороточный альбумин быка (M_r=66 000); каталаза (M_r=252 000); яичный альбумин (M_r=46 000); оксидаза D-аминокислот из почки свиньи (M_r=40 000); трипсин (M_r=23 000); цитохром С из сердца лошади (M_r=12 000); посуда и реактивы, необходимые для проведения фракционирования белков методом электрофореза в полиакриламидном геле (с. 53).

Приготовление образцов. Отвешивают на микроаналитических весах по 0,5 мг белков маркеров и исследуемого белка. Это масса белка рассчитана на проведение анализа в 5—7 аналитических повторностях. Растворяют каждую порцию в 0,5 мл диссоциирующего раствора, представляющего 0,1%-ный раствор СДС в *М трис*-глициновом электродном (с. 55) буфере

(pH 8,6). Белки инкубируют в этом растворе при 37°С в течение 1 ч. По истечении указанного времени в каждый образец добавляют 0,01 мл 5%-ного раствора β-меркаптоэтанола до концентрации 0,1% в общем объеме и немедленно помещают пробы в эксикатор, из которого сразу откачивают воздух и затем в течение 5—7 мин пропускают в него азот. Вакуум-эксикатор с пробами помещают в термостат, работающий в режиме 37°С. Инкубацию в присутствии β-меркаптоэтанола в бескислородной среде осуществляют 1 ч при 37°С. В результате белки подвергаются полной диссоциации, и можно теперь определять их относительные молекулярные массы в диссоциированном состоянии.

Приготовление геля. Электрофорез проводят в 10%-ном полиакриламидном геле, который готовят из исходных растворов (с. 52), за исключением раствора В, где масса акриламида и N,N′-метиленбисакриламида должна быть 40,0 г и 1,07 г соответственно, а добавляемая вода должна содержать 0,8% СДС. Если необходимо, этот раствор фильтруют.

Проведение электрофореза. По завершении инкубации в белковый раствор добавляют 3—4 капли глицерина или этиленгликоля и 3—4 капли 0,2%-ного раствора красителя бромфенолового синего. Общий объем смеси не должен превышать 1 мл. Смесь тщательно перемешивают и 0,1 мл ее микропипеткой вносят в колонку с 10%-ным полиакриламидным гелем. Во вносимом в колонку объеме должно содержаться не менее 50 мкг белка. Сверху в колонку осторожно наслаивают электродный буфер (с. 55), содержащий 0,1% СДС. Электрофорез проводят сначала при силе тока 1 мА (30 мин), а затем — 4 мА на колонку (до завершения электрофореза). Необходимо избегать сильного охлаждения электродных сосудов, так как СДС может выпасть в осадок. Поэтому электрофорез необходимо проводить при комнатной температуре электродных растворов (в воду внешнего сосуда опускают кусочки льда). Во всех колонках длина пробега индикаторной краски (бромфенолового синего) должна быть одинаковой. Электрофорез прекращают, когда пробег красителя-маркера составит 45 мм.

Гель вынимают из стеклянных трубок (с. 56), фронт краски закалывают стеклянным капилляром и фиксируют гель 20%-ным раствором сульфосалициловой кислоты в течение 18 ч (выщелачивание СДС). Затем заменяют раствор сульфосалициловой кислоты 7%-ным раствором трихлоруксусной кислоты, который обновляют трижды с интервалами в 40—50 мин. Белки на гелевых колонках выявляют 0,1%-ным раствором кумасси голубого (10 мин) или 0,2%-ным раствором амидошварца 10В в смеси этанол — уксусная кислота — вода (10 : 1 : 30). Отмывку избытка краски ведут той же смесью. Если в процессе отмывки колонки стали длиннее, положение краски-маркера доводят до исходной величины (45 мм), заливая гели более крепкой отмывающей смесью этанола, уксусной кислоты и воды (30 : 1 : 30). Однако эта процедура не является

обязательной, так как при одинаковом сдвиге фронта индикаторной краски отношение длин пробега белков в геле и величин их относительных молекулярных масс сохраняется. Колонки извлекают из отмывающей смеси, прикладывают к прозрачной мерной линейке и перед источником света измеряют длину пробега каждого белка от линии старта с точностью до 0,1 мм.

Данные о длине пробега в геле того или иного белка-маркера получают при измерении не менее чем в 5 колонках. Целесообразно все 6 колонок блока для электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 21) использовать для выявления длины пробега одного белка, а затем — в том же порядке — всех последующих белков, включая и испытуемый.

Таблица 2. **Исходные данные для построения калибровочной кривой при определении относительной молекулярной массы диссоциированных белков**

Название белков	Величины относительных молекулярных масс белков в присутствии СДС	lg*M*	Длина пробега белка в геле (в мм), т. е. величина *x* (среднее значение из 5 определений)	lg*x*
Сывороточный альбумин быка	66 000	4,82	24,6	1,39
Каталаза	60 000	4,78	25,5	1,41
Яичный альбумин	43 000	4,63	28,0	1,45
Оксидаза D-аминокислот	37 000	4,57	31,0	1,49
Трипсин	23 700	4,37	36,0	1,56
Цитохром С	12 000	4,08	43,0	1,63

Примечание. Данные таблицы получены при работе с 10%-ным полиакриламидным гелем и длине пробега индикаторной краски в нем, равной 45 мм.

Рис. 30. Калибровочная кривая для определения относительной молекулярной массы диссоциированных белков.

График на рисунке 30 демонстрирует линейную зависимость подвижности белков в 10%-ном полиакриламидном геле от величин их относительной молекулярной массы. По оси ординат откладывают значение lg*M*, а по оси абсцисс — значения логарифмов длин пробега, полученные во всех аналитических повторностях опыта. Через полученные точки проводят линию наилучшего соответствия.

Значение относительной молекулярной массы исследу-

емого белка определяют по данному калибровочному графику. Зная среднюю величину пробега исследуемого белка в геле, найденную в тех же условиях эксперимента, которые использовались для белков-маркеров при построении калибровочного графика, вычисляют lg x для исследуемого белка. Восстанавливая перпендикуляр из соответствующей точки на оси абсцисс до пересечения с калибровочной кривой и проводя от нее линию, параллельную оси абсцисс, получают на оси ординат логарифм величины относительной молекулярной массы исследуемого белка.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ НЕДИССОЦИИРОВАННЫХ БЕЛКОВ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ГРАДИЕНТЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПОЛИАКРИЛАМИДНОГО ГЕЛЯ

В предыдущей работе продемонстрирована линейная зависимость величины логарифма относительной молекулярной массы некоторых глобулярных белков и степени их подвижности в полиакриламидном геле. Аналогичная линейная зависимость характерна и при использовании полиакриламидного геля с градиентом концентрации от 3 до 20%. Она может быть выражена графически двумя способами. В одном случае по оси ординат откладывают величину логарифма относительной молекулярной массы белка (lg M_r), а по оси абсцисс — значение логарифма подвижности белков в геле (lg x; x — длина пробега белка в геле в миллиметрах). В другом случае по оси ординат также откладывают lg M_r, но по оси абсцисс — абсолютную величину x в миллиметрах.

Определение относительных молекулярных масс белков этим методом возможно в пределах от 40 000 до 190 000 с ошибкой $\pm 5\%$. При величинах относительных молекулярных масс свыше 200 000 наблюдаются большие отклонения, особенно для функции lg M_r/lg x, которая, как отмечено выше, используется для построения калибровочного графика и при работе в градиенте плотности полиакриламидного геля.

Описываемый метод определения относительных молекулярных масс белков имеет то преимущество, что он основан на наличии соотношения между концентрацией геля и величиной пор в гелевом градиенте с величинами (объемами) молекул белков, при определенных значениях которых подвижность белка уменьшается и приближается к нулю. Таким образом, положение белковых зон в геле, полученное в результате проведения электрофореза, соответствует размеру молекул, входящих в состав этих зон, что дает возможность более точно рассчитывать значения относительных молекулярных масс. В частности, отпадает необходимость проведения сравнительных определений в гелях разных концентраций, что часто используется для повышения точности опыта. Кроме того, работа в градиенте значительно сокращает время опыта и

осуществляется с гораздо меньшими количествами исследуемого материала.

Оборудование, реактивы. Аппарат для приготовления градиента полиакриламидного геля (рис. 31); аппарат для электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 21), рассчитанный на работу с колонками длиной 9—10 см и диаметром 4,5—5,0 мм; набор стеклянных трубок указанных выше размеров и проверенных на равенство их объемов (150 шт.); трихлоруксусная кислота (10%-ная), содержащая 0,001% кумасси голубого; этиленгликоль (30%-ный) в *трис*-глициновом электродном буфере (с. 55), содержащий 0,05% бромфенолового синего; уксусная кислота (10%-ная); яичный альбумин; сывороточный альбумин быка; исходные растворы для приготовления полиакриламидного геля с градиентом концентрации (готовят на 40%-ном по объему растворе этиленгликоля в дистиллированной воде); раствор 1 — триоксиметиламинометан — 12 г; соляная кислота (1 н.) — 15,7 мл, ТЕМЕД — 0,2 мл; этиленгликоль (40%-ный) — до 60 мл; pH раствора доводят до 8,9 1 н. HCl; раствор 2 — акриламид — 35,2 г; N,N′-метиленбисакриламид — 0,28 г; этиленгликоль (40%-ный) — до 100 мл; раствор 3 — персульфат аммония — 0,102 г; сахароза — 26 г; этиленгликоль (40%-ный) — до 55 мл; раствор 4 — акриламид — 7,04 г; N,N′-метиленбисакриламид — 0,20 г; этиленгликоль (40%-ный) — до 100 мл; раствор 5 — персульфат аммония — 0,127 г; этиленгликоль (40%-ный) — до 55 мл; раствор 6 — гексациано-(III)-феррат калия — 0,02 г; вода — до 2 мл;

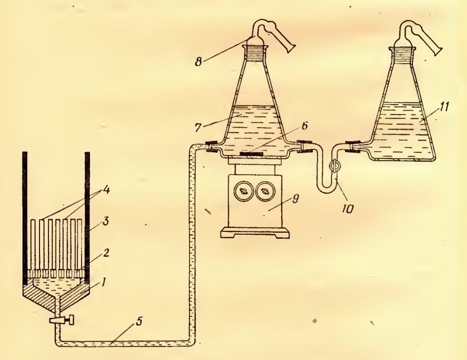


Рис. 31. Аппарат для приготовления градиента полиакриламидного геля:

1 — основание воронки для заполнения электрофоретических трубок; 2 — вкладыш с отверстиями; 3 — стенка цилиндра (диаметр 90 мм), устанавливаемого на основание; 4 — стеклянные трубки; 5 — капиллярный соединительный шланг; 6 — магнитный ротор; 7 — смеситель с раствором В; 8 — хлоркальциевая трубка; 9 — мешалка; 10 — соединительная трубка с краном; 11 — сосуд с раствором А.

раствор 7 — сахароза — 120 г; этиленгликоль (40%-ный) — до 240 мл; раствор 8 — *трис*-оксиметиламинометан — 13,65 г; соляная кислота (1 н.) — 17,9 мл; этиленгликоль (40%-ный) — до 500 мл; pH раствора доводят до 8,9, 1 н. HCl.

Растворы 1, 2, 4, 7 готовят в больших количествах, фильтруют и хранят в холодильнике в темной посуде. Растворы 3 и 5 готовят непосредственно перед проведением опытов.

Приготовление градиента полиакриламидного геля. В вертикально установленную и закрепленную воронку (рис. 31) наливают около 230 мл дистиллированной воды комнатной температуры и поднимают воронку до такого уровня, чтобы вода показалась в выходном отверстии сосуда *7*. После этого краны закрывают. Проверяют, нет ли пузырьков воздуха под диском. Если они обнаруживаются, их убирают с помощью шприца. На диск с отверстиями (рис. 31) ставят вертикально стеклянные трубочки (около 150 шт.). Дно сообщающихся сосудов должно находиться в этот момент на уровне будущей верхней границы геля в трубках (высота геля в трубках при указанных объемах рабочих растворов равна 8 см). Рабочие растворы А и В, предназначенные для смешивания в процессе получения геля с градиентом концентрации полиакриламида в нем, готовят из следующих исходных растворов:

$$A_{20\%} = 23{,}9 \text{ мл (р-р 1)} + 99{,}2 \text{ мл (р-р 2)} + 0{,}4 \text{ мл (р-р 6)} + 51{,}5 \text{ мл (р-р 3)},$$

$$B_{4\%} = 23{,}9 \text{ мл (р-р 1)} + 99{,}2 \text{ мл (р-р 4)} + 0{,}2 \text{ мл (р-р 6)} + 51{,}5 \text{ мл (р-р 5)}$$

Раствор А готовят в ледяной бане. Раствор В — при комнатной температуре; растворы 4 и 5, если они хранились в холодильнике, предварительно доводят до этой же температуры. Раствор В заливают в сосуд *7*, раствор А — в сосуд *11*, включают через реостат магнитную мешалку, открывают зажим между сосудами, затем — зажим между сосудом и воронкой. Скорость перемешивания жидкости в сосуде *7* регулируют реостатом так, чтобы она не заходила в сосуд *11*, но в то же время поступающий плотный 20%-ный раствор из сосуда *11* тотчас полностью перемешивался со всем объемом 4%-ного раствора в сосуде *7*. По мере наполнения воронку следует постепенно опускать, чтобы поддерживать приблизительно постоянную скорость поступления в нее растворов из сосуда *7*. Тотчас после того, как вытечет вся жидкость, в сосуд *11* вливают 225 мл раствора *7*, предварительно охлажденного в ледяной бане. Полимеризация длится 5—6 ч.

Состав растворов и процесс заполнения трубочек обеспечивают начало полимеризации с верхнего их конца благодаря тому, что раствор В содержит больше инициатора полимеризации (персульфата аммония) и меньше ингибитора полимеризации (красной кровяной соли), чем раствор А. Способствует этому также и разница температур растворов А и В. При пониженной температуре в

лаборатории необходим контакт верхнего слоя полимеризующегося в воронке геля с теплой водой (45°С). Вода также устраняет мениск на верхней границе геля. Указанные условия приготовления градиента должны строго соблюдаться, так как при полимеризации выделяется теплота. Если полимеризация начнется снизу, градиент нарушится возникающими конвекционными токами. По окончании полимеризации воду сливают, воронку разбирают, трубочки освобождают от налипшего геля и помещают в раствор 8. В этом растворе трубочки с гелем могут храниться при комнатной температуре 7—10 дней.

Проведение электрофореза. Для построения калибровочной кривой зависимости относительной молекулярной массы стандартных белков от их подвижности в геле берут навеску 0,5—1,0 мг белка, растворяют ее в 0,5—1,0 мл 30 %-ного этиленгликоля, приготовленного на *трис*-глициновом буфере, содержащем краситель бромфеноловый синий (с. 92). Затем 0,1 мл этого раствора микропипеткой вносят на поверхность геля в колонке под электродный буферный раствор (*трис*-глициновый, pH 8, 6), предварительно залитый в трубки. Электрофорез проводят при силе тока 1 мА на трубку в течение первых 30 мин, а затем доводят ее до 3 мА на колонку. Электрофорез прекращают, когда полоса красителя достигнет позиции 0,5 см от нижнего края колонки. Гель вынимают из трубок в соответствии с прописью, данной ранее (с. 56), и закалывают фронт индикаторной краски стеклянным капилляром. Необходимо, чтобы во всех колонках длина пробега индикаторной краски была одинаковой. Гель фиксируют 10%-ной трихлоруксусной кислотой, содержащей 0,001% красителя кумасси голубого, в течение нескольких часов (можно оставить на ночь). Краситель адсорбируется только на осажденных трихлоруксусной кислотой белковых компонентах и не образует фона на остальной части геля. Фиксирующий раствор заменяют 10%-ной уксусной кислотой и измеряют длину пробега белка способом, приведенным в предыдущей работе (с. 90).

Построение калибровочного графика. Результаты измерений вносят в таблицу (табл. 3), в примечании к которой обязательно указывают, при какой величине пробега индикаторной краски измерена длина пробега белков, так как при фиксации в разбавленных растворах трихлоруксусной кислоты длина гелевой колонки возрастает на величину, взаимосвязанную с продолжительностью фиксации. Зависимость подвижности белков от величины относительной молекулярной массы при этом сохраняется.

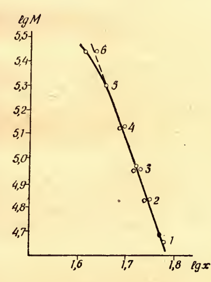
При построении калибровочного графика значения $\lg M$ откладывают на оси ординат, $\lg x$ — по оси абсцисс (рис. 32). Против $\lg M$ взятых в опыт белков наносят экспериментально полученные данные о величинах пробега этих белков, выраженные через $\lg x$. По этим точкам проводят линию наилучшего соответствия. Параллельно со стандартными белками определяют подвижность (x) ис-

Таблнца 3. **Исходные данные для построения калибровочной крнвой прн определеннн относнтельной молекулярной массы неднссоцнированных белков в градиенте полиакриламидного геля**

Названия белков	Величина молекулярных масс белков	lg*M*	Длина пробега белка в геле (мм), т. е. величина *x* (среднее значение из 5 определений)	lg*x*
Яичный альбумин	46 000	4,66	61,5	1,79
Сывороточный альбумнн быка (моиомер)	68 000	4,82	56,0	1,75
Яичный альбумни (днмер)	92 000	4,96	53,0	1,72
Сывороточый альбумин быка (димер)	136 000	5,13	49,0	1,69
Сывороточый альбумнн быка (тример)	204 000	5,30	46,0	1,66
Сывороточый альбумнн быка (тетрамер)	272 000	5,43	42,0	1,62

Прнмечанне. Данные таблнцы получены прн длине пробега нндикаторной краски, равной 85 мм.

следуемого белка градиенте плстности полиакриламидного геля. Откладывают полученное значение $\lg x$ на оси абсцисс, восстанавливают из этой точки перпендикуляр на калибровочный график. Из точки пересечения проводят линию, параллельную оси абсцисс до ее пересечения с осью ординат, снимают искомое значение $\lg M$ и по таблице антилогарифмов находят значение относительной молекулярной массы исследуемого белка.



Рнс. 32. Калнбровочиая крнвая для определения относительной молекулярной массы неднссоциированного белка прн электрофорезе в градиенте полиакриламидного геля:

1 н *3* — янчный альбумин, мономер и днмер соответственно; *2, 4, 5* н *6* — сывороточный альбумнн быка, моиомер, димер, тример и тетрамер соответственно.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ N-КОНЦЕВОЙ АМИНОКИСЛОТЫ В БЕЛКАХ И ПЕПТИДАХ ДНС-МЕТОДОМ

Из трех хорошо известных методов определения N-концевых аминокислот (см. учебник, с. 62—65), а именно динитрофенильного метода Сенджера, фенилизотиоцианатного метода Эдмана и дансильного метода

Грея и Хартли, наиболее распространены последние два. Динитрофенильный метод уступает им по своей чувствительности и по устойчивости получаемых производных аминокислот. Метод Эдмана перспективен благодаря возможности ступенчатого отщепления аминокислот с N-конца пептида или белка, вследствие чего на его основе создан автоматический анализатор последовательности расположения аминокислот в полипептидах. Дансильный метод Грея и Хартли сочетает в себе высокую чувствительность с быстротой и простотой выполнения, что делает его незаменимым при анализе N-концевых аминокислот у пептидов и белков, выделенных из природных источников в ничтожных количествах.

Оборудование, реактивы. Мельница шаровая; мельница ручная дисковая; термостат на 37°С; шкаф для гидролиза на 105—110°С; шкаф сушильный на 120—140°С; испаритель роторный; центрифуга на 3000 об/мин; гомогенизатор на 13 000 об/мин; лампа ультрафиолетовая λ=365 нм; горизонтальный столик для хроматографических сосудов и приготовления пластинок с тонким слоем силикагеля; сосуд стеклянный на 3 л; пластинки стеклянные (6×6 см, толщина 2 мм); хроматографические стеклянные камеры (9,5·7,5·7,0 см) с притертыми крышками; колбочки круглодонные на 5—10 мл; ампулы для дансилирования и гидролиза образцов; плоскодонные колбочки на 5—10 мл с притертыми пробками для стандартных растворов аминокислот; пипетки на 0,1; 1,0 и 10 мл; капилляры стеклянные, отградуированные на 15 мкл и 1 мкл; силикагель марки КСК в гранулах (Салаватский завод); очищенные и перегнанные растворители: ацетон, изопропанол, хлороформ, бензиловый спирт, этилацетат, метанол, ледяная уксусная кислота, диметилформамид, ацетонитрил; аммиак (25%-ный); гидрокарбонат натрия (0,1 н. и 0,2 н.); 0,4 М фосфатный буфер, pH 8,2; соляная кислота (5,7 н., трижды перегнанная над $SnCl_2$); соляная кислота (1 н.); трихлоруксусная кислота (10%-ная); дансилхлорид (хлорангидрид 1-диметиламинонафталин-5-сульфокислоты; ДНС-Cl) в ацетоне (2,5 мг/мл и 6 мг/мл) и в ацетонитриле (0,2 М); 1-диметиламинонафталин-5-сульфокислота (ДНС-OH); хлороксид фосфора; стандартные смеси дансиламинокислот: тип А — *асп, глу, опро, про, ала, сер, ди-гис, гли, три, фен, ди-тир, ала, ди-лиз, лей, иле, вал;* тип В — *асп, цис, глу, арг, асн, сер, тре.* При необходимости в смесь А вводят: *ди-орн, цис, арг, асн, тре,* β*-фен,* β*-ала.*

Дансилирование пептидов. 0,01—0,005 мкмоль пептида растворяют в ампуле в 15 мкл 0,1 н. гидрокарбоната натрия и добавляют 15 мкл раствора дансилхлорида в ацетоне, содержащего 6 мг этого реагента в 1 мл ацетона. Смесь выдерживают в термостате при 37°С в течение 1 ч (или 3—4 ч при комнатной температуре, до исчезновения желтой окраски раствора). Растворитель отгоняют в вакууме и добавляют 50 мкл 5,7 н. раствора соляной кислоты. При охлаждении жидким азотом из ампулы откачивают воздух, запаивают ее и выдерживают 12—16 ч при 105—107°С (в случае, если N-концевыми аминокислотами являются пролин, серин или гистидин, время гидролиза сокращают до 4—6 ч). По окончании гидролиза удаляют соляную кислоту перегонкой в вакууме или сушкой в вакууме-эксикаторе над гидроксидом натрия. Остаток растворяют в ацетоне (в случае дансиллизина и дансиларгинина — в 2 н. NH_4OH) и используют для хроматографического анализа.

Дансилирование белков. При определении N-концевой аминокислоты в белках надо учитывать индивидуальные особенности образца, и в частности растворимость его в используемом растворителе. Если белок растворим в воде, то в ряде случаев применима приведенная выше методика для пептидов. Однако, как правило, необходимо присутствие денатурирующего реагента (например, мочевины). Рекомендуется также использование фосфатного (pH 8,2) буфера вместо гидрокарбонатного, так как он в лучшей степени поддерживает нужное значение pH реакционной среды. 0,1—0,01 мкмоль белка в 300 мкл воды с 250 мг мочевины (свободной от аммиака и цианата) доводят до конечного объема 500 мкл и добавляют 150 мкл 0,4 *М* фосфатного буфера (pH 8,2), 250 мкл диметилформамида и 100 мкл 0,2 *М* раствора дансилхлорида в ацетонитриле. Начальное значение pH раствора 9,4. Через 30 мин при комнатной температуре дансилированный белок в мочевине осаждают добавлением десятикратного по объему количества 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Осадок центрифугируют 10 мин при 3000 *g*, промывают дважды 1 н. раствором соляной кислоты и затем гидролизуют 0,5 мл 5,7 н. раствора соляной кислоты в запаянной ампуле при 110°С в течение 4 ч (в случае N-концевых аминокислот лизина, тирозина, валина, лейцина и изолейцина время гидролиза — 18 ч). Гидролизат упаривают досуха, растворяют в смеси ацетона и 1 н. HCl (9 : 1 по объему) и хроматографируют. Если в гидролизате присутствует ε-ДНС-лизин, то pH гидролизата доводят до 3,5 и экстрагируют эфиром; затем обе фазы исследуют отдельно.

Синтез дансилхлорида (ДНС-Cl). Дансилхлорид, используемый для дансилирования образцов, при необходимости синтезируют следующим образом: 14,7 г ДНС-ОН растворяют в 86 мл перегнанного $POCl_3$ и нагревают с обратным холодильником, снабженным хлоркальциевой трубкой, в течение 1,5—2 ч. Смесь охлаждают и выливают в стакан на 2 л со льдом при помешивании. Стакан помещают в ледяную баню и pH раствора доводят раствором щелочи до 5—6. Выпавший осадок тщательно промывают ледяной водой на фильтре и сушат в вакуум-эксикаторе над оксидом фосфора (V). После высушивания осадок растворяют в ацетоне и отфильтровывают нерастворимую ДНС-ОН; охлажденный фильтрат разбавляют шестью объемами воды. Выделившиеся оранжевые кристаллы отфильтровывают и сушат в вакуум-эксикаторе над оксидом фосфора (V). Выход — 20—30%. Температура плавления — 69—71°С. Чистый ДНС-Cl хранят в эксикаторе над хлоридом кальция в холодильнике.

Техника тонкослойной хроматографии ДНС-аминокислот. Определение N-концевой аминокислоты образца в гидролизате в виде ДНС-производного проводят с помощью микротонкослойной хроматографии на тонко измельченном силикагеле, КСК, путем сравнения пробега неизвестной ДНС-аминокислоты с пробегом известной синтезированной ДНС-амино-

кислоты или соответствующего набора ДНС-аминокислот (о синтезе ДНС-аминокислот см. ниже).

Фракционирование силикагеля для микротонкослойной хроматографии. Гранулы силикагеля марки КСК (Салаватский завод) грубо размалывают в ручной дисковой мельнице, а затем в течение 4—5 ч еще более тонко измельчают в шаровой мельнице. Суспензию 250 г измельченного силикагеля в 2,5 л воды заливают в сосуд (высота слоя жидкости в нем должна быть равна 19 см). После тщательного перемешивания суспензию отстаивают 40 мин. Затем надосадочную жидкость переливают во второй стакан такого же размера и доливают водой до уровня 19 см (осадок от первого отстаивания высушивают при 130—140°С и снова размалывают в шаровой мельнице, подвергая затем вторичному фракционированию). Во втором сосуде суспензию отстаивают еще раз в течение 40 мин. Надосадочную жидкость сливают в третий стакан, в котором суспензию отстаивают 2 ч, после чего жидкость сливают. Осадок вновь заливают водой до прежнего уровня, тщательно перемешивают и отстаивают еще 2 ч (если после второй седиментации надосадочная жидкость очень мутная, можно повторить отмучивание еще несколько раз, отстаивая по 2 ч). После всех этих операций осадок высушивают при 130—140°С в термостате в течение суток. Полученная таким образом однородная фракция силикагеля с частицами величиной от 2,5 до 7,5 мк применяется для приготовления пластин для микротонкослойной хроматографии. Пластины с незакрепленным слоем силикагеля готовят двумя способами.

1. *Наливной способ.* 0,2 г силикагеля растирают в агатовой ступке с 1 мл дистиллированной воды. К полученной пасте добавляют еще 0,8 мл дистиллированной воды и вновь тщательно растирают. Однородную суспензию выливают на тщательно вымытую, обезжиренную с помощью детергента стеклянную пластинку размером 6×6 см и толщиной 2 мм. Пластинку устанавливают на столик с горизонтальной поверхностью, высушивают в течение ночи на воздухе, предохраняя от пыли. Наливным способом можно также готовить пластины с помощью гомогенизатора. 1 г силикагеля в 10 мл воды перемешивают в гомогенизаторе (13 000 об/мин) в течение 1—2 мин. Суспензию порциями по 2 мл выливают на тщательно вымытые и обезжиренные пластинки. Далее действуют, как описано выше.

2. *Способ погружения пластин в суспензию силикагеля с легколетучим растворителем.* Суспензию силикагеля в хлороформе (1 : 4) перемешивают на гомогенизаторе в течение 4—5 мин. Тщательно вымытые и обезжиренные пластинки погружают в суспензию 2—3 раза и устанавливают на столике с горизонтальной поверхностью. Высушивают на воздухе 5—10 мин. Затем пластинку очищают от силикагеля с одной стороны. Данный метод приготовления пластин сопровождается большим расходом силикагеля.

Пластины с закрепленным слоем силикагеля готовят по одному из приведенных выше способов, но к силикагелю добавляют 5—10% гипса.

Приготовление стандартных растворов дансиламинокислот. К 5 мкмоль аминокислоты в 0,25 мл воды добавляют 0,25 мл 0,2 н. раствора гидрокарбоната натрия и 0,5 мл раствора ДНС-Cl в ацетоне (2,5 мг/мл). Раствор инкубируют 2 ч при комнатной температуре, высушивают досуха на роторном испарителе или в вакуум-эксикаторе и растворяют в таком количестве ацетона, чтобы при нанесении на точку старта 1 мкл раствора содержание дансиламинокислоты в пятне было порядка $1 \cdot 10^{-4}$ мкмоль.

Микротонкослойная хроматография ДНС-производных. На две пластинки с тонким слоем силикагеля наносят: на первую — смесь ДНС-аминокислот типа А, на вторую — обработанный гидролизат ДНС-образца. Наносят с помощью капилляра емкостью 0,001 мл в виде пятна размером около 0,5 мм в угол пластинки на расстоянии 1 см от ее краев. В хроматографические камеры, установленные на горизонтальном столике заливают необходимые для анализа системы проявителей на высоту 0,5 см. Для лучшего насыщения стенки камер обкладывают полосками фильтровальной бумаги. Хроматографирование стандартной смеси А проводят двумерным способом в следующих системах проявителей: в первом направлении: ацетон — изопропиловый спирт — 25%-ный аммиак (9 : 7 : 0,5) — один раз и в системе того же состава, но с соотношением ингредиентов 9 : 7 :0,7— другой раз; промежуточное высушивание — 2—3 мин на воздухе; после второго проявления пластинку высушивают при 110°C в течение 5 мин; во втором направлении: хлороформ — бензиловый спирт — этилацетат — ледяная уксусная кислота (6 : 4 : 5 : 0,2). Расположение ДНС-аминокислот на двухмерной микротонкослойной хроматограмме, проявленной указанным выше способом, показано на рисунке 33.

В этой же системе проявителей точно таким же образом осуществляют хроматографирование ДНС-производного N-концевой аминокислоты, содержащегося в гидролизате обработанного ДНС-хлоридом образца белка или пептида.

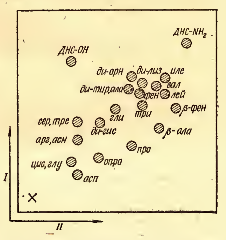


Рис. 33. Расположение ДНС-аминокислот, содержащихся в смеси типа А, на микротонкослойной хроматограмме:

I и II — направление движения проявителя; X — точка нанесения смеси на хроматограмму.

Позиции ДНС-аминокислот на хроматограммах выявляют, рассматривая последние при облучении УФ-светом с λ=365 нм. ДНС-аминокислоты видны при этом в виде ярко флуоресцирующих зеленовато-желтых пятен, а ДНС-гидрат — в виде пятна с голубой флуоресценцией. Чувствительность этого метода обнаружения ДНС-производных очень велика: 10^{-13} моль ДНС-аминокислоты.

По совпадению позиции ДНС-производного гидролизата белка или пептида с позицией одной из ДНС-аминокислот контрольной хроматограммы делают вывод о природе N-концевой аминокислоты в изучаемом препарате.

Если по каким-либо причинам идентификация ДНС-производного исследуемого гидролизата при сопоставлении его позиции на хроматограмме с таковыми ДНС-производных аминокислот стандартной смеси типа А не удается, то применяют смесь типа В. В этом случае проявление хроматограмм со стандартной смесью типа В на одной из них и гидролизата ДНС-белка или пептида на другой ведут в следующих системах. В первом направлении: ацетон-изопропиловый спирт — 25%-ный аммиак (9 : 7 : 2) первый раз и ацетон — изопропиловый спирт — 25%-ный аммиак (9 : 7 : 3) в том же направлении второй раз; промежуточное высушивание 2—3 мин на воздухе. После второго хроматографирования пластинку высушивают в течение 5 мин при 105°С. Во втором направлении: хлороформ — бензиловый спирт — метанол — ледяная уксусная кислота (5 : 4 : 1 : 1). Расположение ДНС-аминокислот, содержащихся в смеси типа В, представлено на рисунке 34.

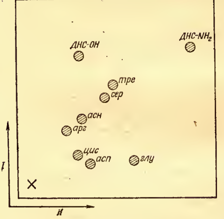


Рис. 34. Расположение ДНС-аминокислот, содержащихся в смеси типа В, на микротонкослойной хроматограмме: I и II — направление движения проявителя; X — точка нанесения смеси на хроматограмму.

Как и ранее, сопоставляя позиции ДНС-аминокислот на этой хроматограмме с таковой ДНС-аминокислоты исследуемого образца, делают вывод о природе последней.

В некоторых случаях для идентиф кации ДНС-производных валина, лейцина, изолейцина, тирозина и аланина используют одномерную микротонкослойную хроматографию. Проявление таких хроматограмм ве ут в системе: хлороформ — этанол — ледя ая уксусная кислота (38 : 4 : 0,28). Изученный гидролизат и ДНС-производные-свидетели наносят на линию старта каждый в отдельно сти.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ С-КОНЦЕВОЙ АМИНОКИСЛОТЫ В БЕЛКАХ И ПЕПТИДАХ КАРБОКСИПЕПТИДАЗНЫМ МЕТОДОМ

Из различных методов определения С-концевых аминокислот в пептидах и белках наибольшей популярностью пользуется ферментативный метод, в котором образец подвергается действию соответствующей карбоксипептидазы (А, В или С) в зависимости от предполагаемой природы С-концевой аминокислоты и с учетом специфичности действия карбоксипептидазы.

Карбоксипептидаза представляет собой пептидогидролазу, отщепляющую аминокислоты от карбоксильного конца полипептидной цепи. Карбоксипептидаза является ферментом-протеином с относительной молекулярной массой, равной 34 300. В ее молекуле 255 аминокислотных остатков. Первичная структура этого фермента выяснена полностью.

Скорость отщепления карбоксипептидазой индивидуальных аминокислот от белковой молекулы различна. Так, карбоксипептидаза А лучше всего осуществляет отщепление аминокислот с ароматическими радикалами, но способна также отщеплять лейцин, изолейцин, метионин, треонин, гистидин, аланин, валин и глутамин. Частично она ускоряет гидролитическое отщепление аспарагиновой кислоты, серина, лизина, метионин-сульфоксида, глицина, аспарагина и глутаминовой кислоты. Такие аминокислоты, как пролин и оксипролин, карбоксипептидазой А не отщепляются совсем. В тех точках полипептидной цепи, где расположены указанные аминокислоты, действие фермента приостанавливается.

В отличие от нее карбоксипептидаза В отщепляет аргинин, лизин и орнитин от С-конца белковой молекулы. Наконец, карбоксипептидаза С отщепляет С-концевой пролин и ароматические аминокислоты.

Оптимум pH карбоксипептидазы 7,4—8,0.

Использование комплекса карбоксипептидаз А, В и С позволяет определять также и последовательность расположения аминокислот начиная с С-конца молекул пептидов и белков. В этом случае строят график скорости отщепления различных аминокислот под действием комплекса карбоксипептидаз.

Оборудование, реактивы. Термостат на 37°С; центрифуга на 6000 об/мин; мешалка магнитная; пробирки стеклянные биологические; суспензия карбоксипептидазы А, очищенной многократной перекристаллизацией от следов трипсина и трипсиногена или обработанной диизопропилфторфосфатом; препараты карбоксипептидаз В и С; гидрокарбонат натрия (1%-ный); гидроксид натрия (0,1 н.); соляная кислота (0,1 н.); N-этилморфолинацетатный буфер с pH 8,3 (0,2М раствор N-этилморфолина доводят ледяной уксусной кислотой до pH 8,3); уксусная кислота (ледяная).

Определение С-концевой аминокислоты с помощью карбоксипептидазы А. Суспензию,

содержащую 100 мкг карбоксипептидазы А, разбавляют 1 мл воды и центрифугируют 5 мин при 6000 *g*. Осадок суспендируют в 0,1 мл 1%-ного раствора гидрокарбоната натрия, охлаждают до 0°С в ледяной бане и при постоянном перемешивании с использованием магнитной мешалки добавляют по каплям 0,1 н. раствор гидроксида натрия до растворения фермента. С помощью 0,1 н. раствора соляной кислоты доводят pH раствора до 8—9 и полученный раствор карбоксипептидазы А приливают к раствору, содержащему 0,1 мкмоль пептида или белка в 0,1 мл 0,2 М N-этилморфолинацетатного буфера (pH 8,3). Реакционную смесь выдерживают при 37°С в течение 4 ч (при определении С-концевой последовательности отбирают пробы через 0,5, 1, 2, 4 ч). Подкисляют ледяной уксусной кислотой до pH 3; добавляют 1 мл воды и центрифугируют 5 мин при 6000 *g*. Надосадочную жидкость упаривают досуха и остаток анализируют на аминокислотном анализаторе или определяют в нем количественное содержание аминокислот любым другим, но достаточно точным методом. Аминокислота, найденная в наибольшем количестве, является С-концевой. При необходимости для идентификации серина, треонина, аспарагина и глутамина используют микротонкослойную хроматографию их ДНС-производных.

Определение С-концевых аминокислот с помощью карбоксипептидазы В. 10 мкг карбоксипептидазы В добавляют к раствору 0,1 мкмоль пептида или белка в 0,1 мл 0,2 М N-этилморфолинацетатного буфера (pH 8,3) и выдерживают при 37°С несколько часов. По окончании ферментативного гидролиза реакционную смесь подкисляют уксусной кислотой до pH 3, упаривают и анализируют на аминокислотном анализаторе или определяют иным методом количественное содержание аминокислот в ней. Аминокислота, найденная в максимальном количестве, признается С-концевой.

Аналогично приведенным выше методам можно определить наличие С-концевого пролина при помощи карбоксипептидазы С.

СЛОЖНЫЕ БЕЛКИ (ПРОТЕИДЫ)

Важнейшие группы сложных белков, содержащих в молекуле в отличие от простых белков добавочные (простетические) группы небелковой природы, рассмотрены в учебнике (см. с 86—94; 124—126; 154—160; 252; 257—264).

НУКЛЕОПРОТЕИДЫ

Нуклеопротеиды — сложные белки, простетической группой которых являются нуклеиновые кислоты — ДНК или РНК. В дезоксирибонуклеопротеидах (ДРНП) и рибонуклеопротеидах (РНП) нуклеиновые кислоты и белки связаны друг с другом в ос-

иовим солевыми связями, которые могут легко диссоциировать, что и происходит достаточио часто в процессе выделения ДРНП и РНП, особеиио в момент воздействия крепких растворов солей.

Выделение нуклеопротеидов можно осуществить различными методами: 1) извлечеиием дистиллированной водой с последующим осаждением иуклеопротеида уксусиой кислотой; 2) экстракцией слабым раствором (0,2—0,4%) щелочи с последующим действием уксусной кислоты; 3) экстракцией растворами хлорида иатрия средних коицентраций, из которых нуклеопротеиды выпадают при разбавлеиии раствора; 4) последовательиым извлечеиием различных нуклеопротеидов сиачала 0,15М раствором хлорида иатрия, затем 1М ее раствором и, накоиец, 0,27%-ным раствором гидроксида натрия; 5) ультрацентрифугированием в градиеите плотности сахарозы или хлорида цезия; 6) фильтроваиием через гель сефадекса или сефарозы.

ВЫДЕЛЕНИЕ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИДОВ (РНП) ИЗ ДРОЖЖЕЙ И КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ ИХ ГИДРОЛИЗА (БЕЛКА, РИБОЗЫ, ПУРИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ И ФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ)

Оборудование, реактивы. Центрнфуга; колба круглодонная длинногорлая на 100 мл с обратным прямым воздушиым холоднльником; ступка (днаметр 110 мм); стакан стеклянный лабораторный с носнком на 200 мл; цнлнндр мерный на 50 мл; воронка стеклянная (диаметр 7—8 см); палочка стеклянная; пробирки стеклянные хнмнческне; песок промытый и прокаленный; пекарские или пивные дрожжн; гндрокснд натрия (0,4%-ный и 10%-ный); уксусная кислота (10%-ная); лакмусовая бумага; соляная кнслота (конц.); сульфат медн (1%-ный); реактив Миллона; орцнновый реактив (см. приложенне); раствор флороглюцнна (см. прнложение); фелингова жидкость (см. прнложение); аммиак (конц.); нитрат серебра (1%-ный); молибдат аммония (см. прнложенне); магнезиальиая смесь (см. приложение); днэтиловый эфир; серная кислота (10%-ная).

Для получеиия рибонуклеопротеидов можио использовать пекарские прессоваииые дрожжи, но лучше взять пивиые дрожжи, которые вначале длительно отмывают от сусла водопроводной водой, а затем отфильтровывают на бюхиеровской воронке.

10 г дрожжей смешивают в ступке со смесью из 2 мл эфира и 2 мл воды, добавляют 5 г песка и тщательно растирают, приливая к растертой массе иебольшими порциями 40—50 мл 0,4%-иого раствора гидроксида натрия. Растирание продолжают еще в течение 15—20 мин. После этого осадок или отфильтровывают, или, лучше, отделяют путем центрифугироваиия. Центрифугат сливают в стакан и к нему прибавляют небольшими порциями (по 0,5 мл) 10%-ную уксусиую кислоту до слабокислой реакции по лакмусу (5—6 мл). Получеииый осадок нуклеопротеидов отделяют цеитрифугированием.

Гидролиз иуклеопротеидов. Одиим из простейших способов разложеиия рибонуклеопротеидов является иагревание их в течеиие 1 ч при 100°C в 10%-ном растворе сериой кислоты.

Прежде всего происходит расщепление нуклеопротеидов на белки и нуклеиновые кислоты. Далее белки гидролизуются до аминокислот, но в этих условиях гидролиз белка будет незначителен. Рибонуклеиновые кислоты в этих условиях расщепляются с образованием пиримидиновых нуклеотидов, пуриновые же нуклеотиды распадаются до пуринов, рибозы и фосфорной кислоты.

В колбу для гидролиза (с обратным воздушным холодильником) помещают осадок нуклеопротеидов и 20 мл 10%-ного раствора серной кислоты. Колбу закрывают пробкой с проходящим через нее воздушным холодильником (трубка длиной 70 см и диаметром 0,7—0,8 см) и смесь кипятят на сетке в течение 1 ч, поддерживая только слабое кипение. Гидролизат отфильтровывают и в прозрачном растворе определяют наличие белков, пентозы, пуриновых оснований и фосфорной кислоты.

Белки обнаруживают с помощью биуретовой или миллоновой реакции.

Пентозу (рибозу) обнаруживают по реакции с орцином

CH_3; HO, OH

или флороглюцином

OH; HO, OH

(или путем восстановления меди в растворе фелинговой жидкости). К 1 мл реактива (орцина или флороглюцина) добавляют половинный объем гидролизата, 1 мл концентрированной соляной кислоты и нагревают до кипения. В первом случае появляется зеленое окрашивание, во втором — розово-красное.

При нагревании с 20%-ной соляной кислотой рибоза дегидратируется и превращается в фурфурол:

$$\text{рибоза} \xrightarrow[\text{нагревание}]{\text{20\%-ная HCl;}} \text{фурфурол} + 3H_2O$$

Последний конденсируется с орцином или флороглюцином с образованием окрашенных соединений. Дезоксирибоза не дает этой реакции.

Пуриновые основания обнаруживают по их реакции с аммиачным раствором оксида серебра. К 2 мл гидролизата приливают по каплям крепкий раствор аммиака до щелочной реакции по лакмусу и добавляют равный объем заранее приготовленного аммиачного раствора оксида серебра. Постепенно образуется осадок серебряных солей пуриновых оснований.

Фосфорную кислоту обиаруживают с помощью молибдата аммония или магиезиальиой смеси.

1) К 2 мл раствора молибдата аммония в азотной кислоте прибавляют 1 мл испытуемого раствора. Смесь слегка иагревают. Образуется желто-зелеиый осадок фосфоромолибдата аммония $(NH_4)_3PO_4 \cdot 12MoO_3$ (с. 282).

2) К 2 мл гидролизата постепеино прибавляют концеитрированиый раствор аммиака до резкого запаха, после чего добавляют равиый объем магиезиальной смеси. Образуется кристаллический осадок (потираиие стеклянной палочкой) фосфата магний-аммония $MgNH_4PO_4$ (с. 282).

ВЫДЕЛЕНИЕ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОПРОТЕИДОВ (ДРНП) ИЗ СЕЛЕЗЕНКИ И ПРОВЕДЕНИЕ КАЧЕСТВЕННЫХ РЕАКЦИЙ НА ПРОДУКТЫ ИХ ГИДРОЛИЗА

Дезоксирибоиуклеопротеиды выделяют из тканей, богатых клеточиыми ядрами (зобиая железа, селезеика, сперматозоиды и проч.). ДРНП растворяются в растворах солей средней коицеитрации, например в хлориде натрия (1 М), с образоваиием вязких растворов и снова осаждаются при разведеиии последиих (до 0,15 М) в виде волокнистого нуклеопротеида.

Оборудованне, реактнвы. Центрнфуга; баня водяная; деревянные палочкн с насечкамн; цнлнндр мерный на 50 нлн 100 мл; стакан стеклянный лабораторный с носиком, высокнй, на 500 мл; ступка (днаметр 110 мм); селезенка (нлн другой орган); песок промытый и прокаленный; соляная кнслота (1 н.); хлорнд натрия (0,1 М н 2 М); гндрокснд натрня (0,4%-ный); днфениламнн (см. прнложенне); рнбоза (1%-ная); фукснсерннстая кнслота (см. прнложенне).

В ступке растирают 5 г селезенки с равиым количеством песка, добавляют вначале 5 мл охлаждеииого 2 М раствора хлорида иатрия, а затем постепеиио малыми порциями 25 мл охлаждеииого 1 М раствора хлорида иатрия. Растираиие продолжают 10—15 мии в ступке, охлаждаемой льдом. Образовавшуюся массу переиосят в цеитрифужиые пробирки и цеитрифугируют 15 мии. Измерив объем получеииого цеитрифугата, вливают его в шестикратиый объем воды тонкой струей, медлеино размешивая жидкость деревянной палочкой. Выделившийся в виде нитей иуклеопротеид иаматывается на деревяииую палочку.

Если иити ДРНП не образовались, а выделился хлопьевидиый осадок, то следует дать отстояться осадку, осторожио слить с иего весь прозрачный отстой, а остаток жидкости подвергиуть цеитрифугироваиию. Осадок после центрифугироваиия исследуют на содержание в ием ДНК.

Реакция с дифениламином

Дезоксирибоиуклеииовую кислоту обнаруживают по ее реакции с дифениламином, который с дезоксирибозой дает сииее окрашиваиие. Рибонуклеиновая кислота (или рибоза), в отличие от ДНК, дает с этим реактивом зелеиое окрашивание.

В пробирку переносят немного осадка ДНК и растворяют его в 1—2 мл 0,4%-ного раствора гидроксида натрия. К раствору добавляют равный объем раствора дифениламина и смесь нагревают в кипящей водяной бане около 10—15 мин. Появляется синее окрашивание раствора. В другой пробирке нагревают с дифениламином раствор рибозы, к которому добавлено 1—2 мл 0,4%-ного раствора щелочи. Смесь окрашивается в зеленый цвет.

Реакция с фуксинсернистой кислотой

Дезоксирибонуклеиновая кислота после мягкого кислотного гидролиза при взаимодействии с фуксинсернистой кислотой окрашивается в фиолетовый цвет. В результате кислотного гидролиза происходит распад гликозидных связей с пуриновыми основаниями. Образуется апуриновая ДНК с открытой формой дезоксирибозы, содержащей свободную альдегидную группу:

Открытая форма 2-дезоксирибозы вступает в реакцию с фуксинсернистой кислотой по альдегидной группе. Гликозидные связи рибозы, входящей в состав рибонуклеиновой кислоты, не подвергаются гидролизу в тех мягких условиях, в которых он идет у дезоксирибонуклеиновой кислоты.

В центрифужную пробирку берут небольшое количество дезоксирибонуклеопротеида или дезоксирибонуклеиновой кислоты, добавляют 2 мл 1 н. раствора соляной кислоты, нагретой до 60°С, и пробирку ставят в водяную баню на 10 мин при 60°С. По охлаждении центрифугируют, сливают кислоту и к осадку прибавляют фуксинсернистую кислоту. Через некоторое время появляется фиолетовое окрашивание осадка.

ОБНАРУЖЕНИЕ НУКЛЕОПРОТЕИДОВ В СОСТАВЕ ТКАНЕВЫХ БЕЛКОВ, РАЗДЕЛЕННЫХ НА ФРАКЦИИ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Оборудование, реактивы. Центрифуга рефрижераторная до 15 000 *g*; сосуд Дьюара с жидким азотом; ступка (диаметр 90 мм); электродный *трис*-глициновый буфер, pH 8,6 (приготовление см. с. 55); пиронин (0,04%-ный) в этиловом

спирте (96%-ном); грена тутового шелкопряда или любая другая (только что взятая) свежая ткань животного происхождения, а также все оборудование и реактивы, необходимые для определения содержания белка по Лоури (с. 75) и фракционирования белков методом электрофореза в полиакриламидном геле (с. 52).

Грену тутового шелкопряда (или другую ткань), взятую в количестве 0,1—0,5 г, тщательно растирают в ступке до тонкого порошка в жидком азоте. Приливают 1 мл *трис*-глицинового электродного буфера (pH 8,3; приготовление см. с. 55) и экстрагируют белки в течение 30 мин, продолжая растирание в ступке. Твердый остаток отделяют центрифугированием при 15 000 *g* в течение 30 мин в рефрижераторной центрифуге при температуре не выше 5°С. В полученном экстракте определяют содержание белка по методу Лоури (с. 75). Разводят экстракт *трис*-глициновым буфером, применяемым для экстракции, до содержания белка 8 мг/мл. 0,1 мл этого раствора наносят на колонку полиакриламидного геля для получения данных о количестве белковых фракций в вытяжке.

Для выявления нуклеопротеидов приливают к экстракту 0,4%-ный раствор пиронина в 96%-ном этаноле из расчета 1 часть его на 10 частей вытяжки. Выдерживают 1 ч при комнатной температуре и 0,1 мл смеси наносят на колонку полиакриламидного геля.

Фракционирование белков контрольной (без добавления пиронина) и опытной проб ведут в соответствии с прописью, приведенной ранее (с. 52). По окончании электрофореза позиции белков на контрольной колонке выявляют окрашиванием амидошварцем 10В. В опытной пробе дополнительного окрашивания не требуется, так как фракции белков, содержащие нуклеопротеиды, видны здесь в виде розовых полос.

Измеряют длины пробега каждой белковой фракции в контроле и опыте, рассчитывают значения относительной электрофоретической подвижности каждой фракции и результаты в виде рисунка (рис. 35) заносят в рабочий журнал. Делают вывод о доле нуклеопротеидов в общем белковом спектре ткани.

Пользуясь этим методом, удобно сопоставлять динамику нуклеопротеидов в развивающихся эмбрионах, тканях организма и т. п.

ГЛИКОПРОТЕИДЫ

Характеристика основных представителей гликопротеидов дана в учебнике (см. с. 88—90). В связи с тем что в последние годы все большее и большее число белков переходит в разряд гликопротеидов, реакции обнаружения в их составе углеводной компоненты приобретают принципиальное значение.

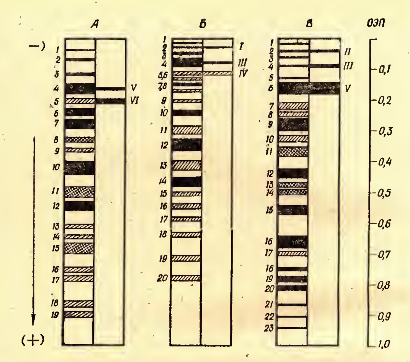


Рис. 35. Изменение числа фракций нуклеопротеидов и содержания каждой из них в развивающейся грене тутового шелкопряда:

А, Б, В — 1-й, 5-й и 9-й дни развития грены соответственно; ОЭП — шкала величин относительной электрофоретической подвижности белковых фракций; 1—23 — номера белковых фракций; I—VI — номера белковых фракций, содержащих нуклеопротеиды.

ДОКАЗАТЕЛЬСТВО НАЛИЧИЯ УГЛЕВОДА В ЯИЧНОМ АЛЬБУМИНЕ

Оборудование, реактивы. Пробирки стеклянные химические; α-нафтол (0,1%-ный) в этаноле (96%-ном); тимол (1%-ный) в этаноле (96%-ном); серная кислота (конц.); разбавленный раствор яичного альбумина (приготовление см. с. 62).

В две пробирки берут по 4—5 мл разбавленного раствора яичного альбумина, прибавляют в одну из них 0,5 мл 0,1%-ного раствора α-нафтола, а в другую столько же 1%-ного раствора тимола и хорошо перемешивают. В обе пробирки осторожно по стенке наслаивают концентрированную серную кислоту. В первом случае при стоянии на границе раствора наблюдают фиолетовое, а во втором — красное кольцо. Окрашенные кольца возникают за счет реакции фурфурола (образуется при взаимодействии концентрированной серной кислоты с углеводом белка) с α-нафтолом или тимолом.

Обнаружение гликопротеидов в составе тканевых белков, разделенных методом электрофореза в полиакриламидном геле

Оборудование, реактивы. Центрифуга рефрижераторная до 15 000 *g*; сосуд Дьюара с жидким азотом; ступка (диаметр 90 мм); электродный *трис*-глициновый буфер, pH 8,6 (приготовление см. с. 56); трихлоруксусная кислота (12,5%-ная); иодная кислота (1%-ная) в уксусной кислоте (3%-ной); фуксинсернистая кислота (см. приложение); пиросульфит натрия (0,5%-ный); а также все оборудование и реактивы, необходимые для определения содержания белка по Лоури (с. 75) и фракционирования белков методом электрофореза в полиакриламидном геле (с. 52).

Получение белкового экстракта из грены тутового шелкопряда или любой другой свежей (только что взятой) ткани животного происхождения, подготовку его к анализу и фракционирование белков ведут в соответствии с прописью (с. 55—56).

Колонку полиакриламидного геля, предназначенную для обнаружения гликопротеидов, фиксируют в течение 30 мин в 12,5%-ном растворе трихлоруксусной кислоты, которую отмывают сначала в течение 2 ч проточной, а затем в течение 15 мин дистиллированной водой. Далее погружают колонку в 1%-ный раствор иодной кислоты в 3%-ном растворе уксусной кислоты на 1 ч. Указанную реакцию окисления цисгликольных группировок углеводных компонентов белков ведут при 0°С (в ледяной бане). Избыток реактивов отмывают дистиллированной водой, сменяя ее шестикратно через каждые 10 мин. Образовавшиеся в результате окисления альдегидные группы обнаруживают свежеприготовленным раствором фуксинсернистой кислоты, инкубируя в нем колонку в темноте в течение 30—40 мин. Колонки промывают свежеприготовленным 0,5%-ным раствором пиросульфита натрия (трижды) и водой (несколько раз). Белковые фракции, содержащие гликопротеиды, выявляются в виде полос кирпично-красного цвета.

В контроле обнаруживают белки на колонке при посредстве окрашивания амидошварцем 10В (с. 57). Вычисляют значение ОЭП для каждой белковой фракции в контроле и опыте. На основании полученных данных делают вывод о квоте гликопротеидов в составе тканевых белков, а также о наличии гликопротеидов в конкретных белковых фракциях. Результаты выражают в виде рисунка (рис. 36).

ХРОМОПРОТЕИДЫ

Хромопротеиды — сложные белки, простетической группой которых является окрашенное соединение. Существует несколько видов хромопротеидов, отличающихся составом и строением простетической группы (см. учебник, с. 90—92) Наиболее доступны для лабораторных работ хромопротеиды, у которых простетической группой являются производные порфирина. К ним относится, в частности, дыхательный белок крови — гемоглобин.

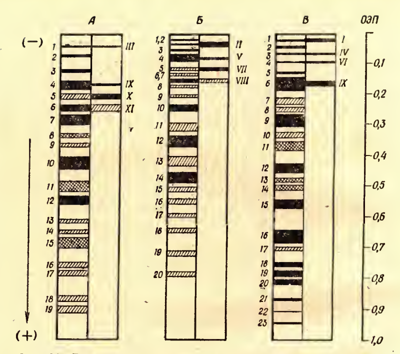


Рис. 36. Динамика гликопротеидов в развивающейся грене тутового шелкопряда:

А, Б, В — 1-й, 5-й и 9-й дни развития грены соответственно: I—*23* — номера белковых фракций; I—XI — номера белковых фракций, содержащих гликопротеиды.

Оборудование, реактивы. Холодильник; микроскоп; центрифуга; палочка стеклянная; стакан стеклянный лабораторный на 100 мл; воронка стеклянная (диаметр 6—8 см); банка с притертой пробкой на 50 мл; пипетка градуированная на 1—2 мл; пробирки стеклянные химические; предметные и покровные стекла; кровь свежевыпущенная или оксалатная; эфир диэтиловый; сульфат аммония (насыщ.); оксалат калия (3%-ный); хлорид натрия (0,9%-ный); этанол; уксусная кислота (ледяная) с хлоридом натрия (в 100 г кислоты 0,1 г тонкорастертого хлорида натрия).

ПОЛУЧЕНИЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКОГО ОКСИГЕМОГЛОБИНА

Гемоглобин выделяют из эритроцитов путем гемолиза, т. е. разрушения их, что можно вызвать добавлением дистиллированной воды или обработкой эфиром, а также толуолом. При разбавлении крови водой понижается осмотическое давление плазмы и вода начинает проникать в эритроциты. Эритроциты набухают, а затем разрушаются, и гемоглобин переходит в водный раствор. Добавление эфира способствует растворению липоидной оболочки эритроцитов, что облегчает выход содержимого эритроцита наружу. Так как при гемолизе гемоглобин выходит в плазму, то необходимо освободиться от белков плазмы. Этого достигают осажде-

нием белков насыщенным раствором сульфата аммония, который способствует также медленной кристаллизации гемоглобина.

К 10 мл крови (кролика, собаки, лошади) прибавляют 2 мл смеси воды и эфира (1 : 1) и перемешивают до полного гемолиза крови. Контролируют гемолиз под микроскопом. Красная прозрачная жидкость называется гемолизированной или лаковой кровью. К жидкости прибавляют равный объем (12 мл) насыщенного раствора сульфата аммония, перемешивают и тотчас центрифугируют или отфильтровывают от выпавшего осадка белков. Фильтрат оставляют на холоде в закрытом сосуде на сутки. По истечении этого срока под микроскопом наблюдают кристаллы оксигемоглобина в виде призм или пластинок красного цвета.

ОБНАРУЖЕНИЕ ГЕМИНОВОЙ ГРУППЫ ГЕМОГЛОБИНА КРОВИ ПОСРЕДСТВОМ БЕНЗИДИНОВОЙ И ГВАЯКОВОЙ ПРОБ

Оборудование, реактивы. Пробирки стеклянные химические; дефибринированная кровь (приготовление см. с. 49); пероксид водорода (3%-ный); свежеприготовленный бензидин (5%-ный) в ледяной уксусной кислоте; гваяковая смола (2%-ная) в этаноле (95%-ном).

Несколько капель дефибринированной крови разводят водой до 5 мл и полученный раствор делят на две части. К одной из них приливают равный объем раствора бензидина, а к другой — гваяковой настойки. Перемешивают и в каждую из пробирок добавляют по нескольку капель 3%-ного раствора пероксида водорода. В обоих случаях развивается окраска от зеленого до синего тона.

Развитие окраски связано с окислением бензидина и гваяковой смолы пероксидом водорода. В обычных условиях эта реакция идет очень медленно, но в присутствии катализаторов — моментально. Гем, обладающий каталитической активностью в этой реакции, резко ускоряет окисление бензидина и гваяковой смолы. Реакция очень чувствительна и под названием бензидиновой или гваяковой пробы на кровь применяется в судебно-медицинской экспертизе.

ФОСФОПРОТЕИДЫ

Фосфопротеиды — сложные белки, простетической группой которых является ортофосфорная кислота (см. учебник, с. 87). Наиболее доступен для изучения фосфопротеид молока — казеин. Он обладает кислыми свойствами и в молоке находится в виде растворимой кальциевой соли.

Оборудование, реактивы. Баня песочная; стакан стеклянный лабораторный на 200 мл; палочка стеклянная; воронка стеклянная (диаметр 7—8 см); ступка (диаметр 70 мм); пробирки стеклянные лабораторные тугоплавкие; пипетка градуированная на 1 мл; бумага фенолфталеиновая; бумага фильтровальная; молоко снятое; уксусная кислота (0,1%-ная); карбонат натрия (0,1%-ный); этанол; диэтиловый эфир; смесь метилового спирта и хлороформа (1 : 1); серная кислота (конц.); азотная кислота (конц.); гидроксид натрия (5 н.); серная кислота (5 н.); молибдат аммония (см. приложение).

ВЫДЕЛЕНИЕ КАЗЕИНА ИЗ МОЛОКА

Казеин выделяют чаще всего путем подкисления молока, т. е. методом, введенным еще Г. Я. Мульдером в начале прошлого века. Считают, что казеин содержится в молоке в виде казеиногена, который в процессе выделения превращается в казеин.

30 мл снятого молока разбавляют четырьмя объемами воды в стакане на 200 мл и при помешивании добавляют к нему по каплям 0,1%-ный раствор уксусной кислоты до прекращения выделения осадка казеина. Необходимо избегать избытка кислоты, так как казеин растворяется в нем. Казеин отфильтровывают, промывают водой и для очистки от жиров и других веществ растворяют в 0,1%-ном растворе карбоната натрия. Казеин растворяется, жир остается во взвешенном состоянии. Смесь фильтруют через влажный фильтр, при этом жиры остаются на фильтре.

Фильтрат, содержащий натриевую соль казеина, снова осаждают 0,1%-ным раствором уксусной кислоты. Осадок казеина отфильтровывают, отжимают между листами фильтровальной бумаги по возможности досуха и растирают для обезвоживания в ступке со спиртом (15—20 мл). Затем казеин встряхивают в большой пробирке для удаления жира сначала с эфиром, а затем с 20 мл смеси метилового спирта и хлороформа (1 : 1). Полученный чистый казеин после высушивания на воздухе представляет собой белый порошок.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАЛИЧИЯ ОСТАТКА ФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ В КАЗЕИНЕ

В 100 г казеина содержится примерно 0,8 г фосфора в составе фосфорной кислоты. Обнаружение фосфора в казеине осуществляют сжиганием казеина в смеси концентрированных серной и азотной кислот. Навеску казеина около 0,05 г смешивают в тугоплавкой пробирке с 0,3 мл (пятью каплями) концентрированной серной и таким же количеством азотной кислоты. Пробирку нагревают в песочной бане. Смесь обугливается, а при дальнейшем нагревании принимает бурую окраску. Через 10 мин, если раствор не обесцветится, добавляют еще 2 капли азотной кислоты и продолжают нагревание. Так поступают и дальше, пока смесь не обесцветится. Затем добавляют 2 мл воды и продолжают нагревание для удаления оставшейся азотной кислоты. После этого смесь нейтрализуют по фенолфталеиновой бумаге, прибавляя по каплям 5 н. раствор гидроксида натрия. Если добавлен избыток щелочи, то его нейтрализуют одной-двумя каплями 5 н. раствора серной кислоты. Раствор делят на две части и проверяют наличие в нем фосфорной кислоты молибдатом аммония и магнезиальной смесью (с. 104).

Определить фосфор в казеине можно и количественно по прописи, приведенной на странице 105.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКИ КАЗЕИНА

Оборудование, реактивы. Баня водяная; пробирки стеклянные химические; бюретки прямые с краном на 10 и 50 мл; пипетка с одной меткой на 1 мл; колба мерная на 200 мл; уксусная кислота (0,1 н.); казеин; ацетат натрия (0,1 н.).

Являясь амфотерными электролитами, белки диссоциируют с образованием как положительно, так и отрицательно заряженных групп. При определенном pH среды можно добиться такого соотношения ионизированных групп, при котором белковый раствор наименее устойчив и белок выпадает в осадок. Испытывая поведение белка при различных концентрациях водородных ионов в растворе, находят значение pH среды, соответствующее изоэлектрической точке белка.

В пять пробирок приливают из бюретки следующие количества 0,1 н. раствора уксусной кислоты: в первую — 0,25 мл; во вторую — 0,5 мл; в третью — 1,0 мл; в четвертую — 2,0 мл и в пятую — 4,0 мл. Из другой бюретки в той же последовательности в каждую пробирку прибавляют 8,75 мл; 8,5 мл, 8,0 мл, 7,0 мл и 5,0 мл воды. После добавления раствора казеина в ацетате натрия (см. ниже) значения pH в полученных смесях будут равны 5,3; 5,0; 4,7; 4,4 и 4,1 соответственно.

Готовят 0,1%-ый раствор казеина (получение казеина см. в приложении) следующим образом: 0,2 г казеина растворяют при небольшом нагревании на водяной бане в 5 мл 0,1 н. раствора ацетата натрия и доводят полученный раствор до объема 200 мл раствором ацетата натрия той же концентрации.

В каждую из пробирок приливают пипеткой по 1 мл раствора казеина и наблюдают за степенью помутнения раствора в них. Там, где помутнение максимально, pH раствора соответствует изоэлектрической точке белка (pH 4,7). Найденное значение pH заносят в рабочий журнал.

ЛИПОПРОТЕИДЫ

В качестве простетической группы липопротеиды содержат те или иные липиды (см. учебник, с. 92 и 162). Поэтому их выделяют из биологического материала экстракцией жирорастворителями, а также обнаруживают окрашиванием суданом. Наиболее чувствительным и перспективным методом выявления липопротеидов в составе сложных белковых смесей является в настоящее время микроэлектрофорез в гелях.

ОБНАРУЖЕНИЕ ЛИПОПРОТЕИДОВ В СОСТАВЕ ТКАНЕВЫХ БЕЛКОВ, РАЗДЕЛЕННЫХ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Оборудоваиие, реактивы. Центрифуга рефрижераторная до 15 000 *g*; сосуд Дьюара с жидким азотом; ступка (диаметр 110 мм); электродиый *трис*-глициновый буфер, pH 8,6 (приготовление см. с. 55); судаи черный В (0,04%-иый) в этаноле (96%-ном); греиа тутового шелкопряда или другая ткаиь животиого происхождеиия (только что взятая), а также все оборудование и реактивы, необходимые для определеиия содержания белка по Лоури (с. 75) и фракциэнирования белков методом электрофореза в полиакриламидном геле (с. 52).

Получение белкового экстракта из грены тутового шелкопряда или других тканей животного происхождения, подготовку его к анализу и разделение белков в нем ведут в соответствии с прописью на странице 55. Общий белковый спектр ткани выявляют путем окрашивания белков на предназначенной для этого полиакриламидной колонке амидошварцем 10В (с. 57).

Чтобы обнаружить липопротеиды, к экстракту белков приливают 0,04%-ный раствор судана черного В в 96%-ном этаноле (10:1). После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре 0,1 мл указанной смеси фракционируют методом электрофореза в полиакриламидном геле, как описано ранее (с. 56). Белковые фракции, содержащие липопротеиды, видны на колонке в виде синих полос.

Измеряют длину пробега каждой белковой фракции на колонке с общим белковым спектром и длину пробега каждой липопротеидной фракции на колонке с выявленными липопротеидами. Зная длину пробега индикаторной краски, рассчитывают ОЭП каждого белка. На основании этих данных оформляют результаты опыта графически, как это показано на рисунке 37. Сопоставляя позиции белков, выявленных амидошварцем и суданом, делают вывод о степени распространения липопротеидов в растворимых белках данной ткани. Данный метод применяется для наблюдений за изменением содержания липопротеидов в процессе развития организма (рис. 37).

ОБМЕН БЕЛКОВ

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ БЕЛКА

Общая схема ферментативного гидролиза белков приведена в учебнике (с. 330). Степень распада белка при действии на него ферментов (пептидогидролаз) можно проследить по увеличению количества α-аминных групп, освобождающихся при гидролизе пеп-

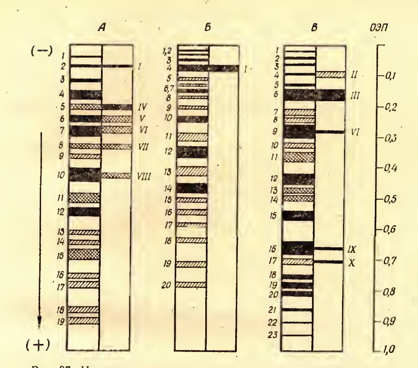


Рис. 37. Изменение содержания липопротеидов в процессе развития эмбриона тутового шелкопряда:

А, Б, В — 1-й, 5-й и 9-й дни развития грены соответственно: *1—23* — номера белковых фракций; I — X — номера белковых фракций, содержащих липопротеиды.

тидных связей белка в его растворе. Чем больше освободилось α-аминных групп, тем соответственно больше распалось пептидных связей и тем выше, следовательно, степень деструкции белковой молекулы.

НАКОПЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ α-АМИННЫХ ГРУПП В ПРОЦЕССЕ ГИДРОЛИЗА БЕЛКА ПРИ УЧАСТИИ ТРИПСИНА

Трипсин представляет собой пептид-пептидогидролазу и специфически ускоряет реакцию гидролиза пептидных связей в тех точках полипептидной цепи белка, где расположены остатки аргинина и лизина. Наличие положительного заряда в аминокислотном радикале, расположенном рядом с пептидной связью, является причиной специфического ускорения трипсином гидролиза именно тех

пептидных связей, которые образованы указанными аминокислотами:

$$H[HN{-}\underset{\underset{R'}{|}}{CH}{-}CO]_x{-}NH{-}\underset{\underset{\underset{\underset{NH_3^+}{|}}{(CH_2)_4}}{|}}{CH}{-}CO{-}[NH{-}\underset{\underset{R''}{|}}{CH}{-}CO]_y{-}NH{-}\underset{\underset{\underset{\underset{\underset{H_2\overset{+}{N}=C-NH_2}{|}}{NH}}{|}}{(CH_2)_3}}{|}}{CH}{-}CO{-}[NH{-}\underset{\underset{R'''}{|}}{CH}{-}CO]_z OH$$

Остаток лизина *Остаток аргинина*

$$\xrightarrow[\text{Трипсин}]{n H_2O}$$

$$H[HN{-}\underset{\underset{R'}{|}}{CH}{-}CO]_x{-}NH{-}\underset{\underset{\underset{\underset{NH_3^+}{|}}{(CH_2)_4}}{|}}{CH}{-}COOH + H[NH{-}\underset{\underset{R''}{|}}{CH}{-}CO]_y{-}NH{-}\underset{\underset{\underset{\underset{\underset{H_2\overset{+}{N}=C-NH_2}{|}}{NH}}{|}}{(CH_2)_3}}{|}}{CH}{-}COOH + H[NH{-}\underset{\underset{R'''}{|}}{CH}{-}CO]_z OH$$

Пептид I *Пептид II* *Пептид III*

Строение трипсина хорошо изучено. Этот белок с относительной молекулярной массой, равной 23 950, состоит из 228 аминокислотных остатков. Первичная структура трипсина полностью выяснена, и многое известно о его вторичной и третичной структурах. В частности, важнейшую роль в его каталитической активности играет активный центр, в состав которого входят радикалы серина (183-й аминокислотный остаток в молекуле) и гистидина (29-й и 46-й аминокислотные остатки в молекуле). Именно благодаря сочетанию перечисленных аминокислотных остатков в молекуле трипсина и осуществляется гидролиз пептидной связи. Механизм этого процесса выяснен.

Оборудование, реактивы. Фотоэлектроколориметр; термостат; баня водяная; пробирки стеклянные (10 шт.); штатив лабораторный; пипетки градуированные на 1 и 5 мл; раствор казеина (10 мг в 1 мл). Навеску казеина растворяют в небольшой порции 0,1%-ного раствора карбоната натрия при осторожном нагревании, разбавляют дистиллированной водой и осторожно нейтрализуют 0,1 н раствором соляной кислоты); раствор трипсина (0,25 мг в 1 мл); 0,2М *трис*-HCl буфер (pH 8,0) смешивают 50 мл 0,4М раствора триоксиметил-аминометана с 26,8 мл 0,4 н. раствора соляной кислоты и доводят до 100 мл дистиллированной водой; буферный раствор для проведения нингидриновой реакции (pH 5,3—5,4 растворяют 270 г ацетата натрия в 200 мл дистиллированной воды, добавляют 50 мл перегнанной уксусной кислоты и доводят до 750 мл дистиллированной водой); нингидрин (3%-ный) в свежеперегнанном метилцеллозольве; изопропиловый спирт (50%-ный).

В две пронумерованные пробирки вносят по 1 мл 0,2М *трис*-HCl буфера, pH 8,0 и по 1 мл 1%-ного раствора казеина. В одну из пробирок (опыт) приливают 1 мл 0,025%-ного раствора трипсина, в другую (контроль) — 1 мл 0,025%-ного раствора трипсина, заранее инактивированного длительным (не менее 1 ч) нагре-

ванием на кипящей водяной бане. Растворы хорошо перемешивают и немедленно берут из каждой пробирки (в первую очередь из опытной, потом из контрольной) по 0,5 мл содержимого в две тщательно вымытые пробирки. Опытную и контрольную пробы ставят в термостат и инкубируют в течение 2 ч, отбирая из них аликвоты по 0,5 мл через 0,5; 1 и 2 ч.

В отобранных аликвотах проводят реакцию на наличие свободных α-аминогрупп, для чего их помещают в кипящую водяную баню на 10 мин. Затем охлаждают до комнатной температуры, после чего прибавляют по 0,5 мл дистиллированной воды, 0,5 мл ацетатного буфера (pH 5,4) и 0,5 мл нингидринового реактива. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и помещают для развития окраски в водяную баню при температуре 95°С на 7—10 мин. Затем, не вынимая пробирок из бани, прибавляют в каждую из них 5 мл 50%-ного раствора изопропанола.

Оптическую плотность опытной пробы измеряют против контроля на фотоэлектроколориметре при длине волны 507 нм (зеленый светофильтр).

Полученные результаты выражают графически, откладывая по оси абсцисс время инкубации, по оси ординат — значения оптических плотностей. Полученная кривая наглядно демонстрирует динамику высвобождения во времени свободных аминогрупп в процессе гидролиза казеина в присутствии трипсина.

ГИДРОЛИЗ БЕЛКА В ПРИСУТСТВИИ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ

Оборудоваиие, реактивы. Центрифуга лабораториая; термостат для инкубацни проб при 37°С; баня водяиая; насос водоструйиый стеклянный; сосуд Дьюара с жидким азотом; прнбор для дналнза; колба Бунзена с воронкой Бюхнера; чашка выпарнтельиая иа 50 мл; воронка стеклянная; стаканы стекляниые лабораторные иа 2 л (1 шт.) н иа 100 мл (2 шт.); цнлиндры мерные: иа 1000 мл (2 шт.), на 100 мл (1 шт.), иа 25 мл (1 шт.); пробнрки стекляииые хнмнческие; пипеткн градунрованиые на 1 н 2 мл; препарат поджелудочиой железы; марля; бумага ннднкаторная; хлорнд натрня (2%-ный); толуол; уксусная кислота (5 н.); тетрабром-*м*-крезолсульфофталенн (0,02%-иый); сульфат аммоння; раствор белка (2%-ный), гидрокарбоиат иатрня; карбокснпептндаза (0,1%-иая); диизопропилфторфосфат; этиловый спирт (96%-ный).

П о л у ч е н и е   п р е п а р а т а   к а р б о к с и п е п т и д а з ы. 500 *г* замороженной поджелудочной железы тщательно измельчают (лучше в жидком азоте), заливают 1500 мл 2%-ного раствора хлорида натрия и добавляют 100 мл толуола. Содержимое сосуда перемешивают и оставляют на ночь при комнатной температуре. По истечении указанного срока снимают пену, отсасывают при помощи водоструйного насоса толуол и фильтруют через двойной слой марли. Фильтрат подкисляют 5 н. раствором уксусной кислоты до pH 4, пользуясь раствором тетрабром-*м*-крезолсульфофталеина (бромкрезолового зеленого) в качестве индикатора (переход окраски от синей к желтой). Снова фильтруют раствор, пользуясь воронкой Бюхнера. Карбоксипептидазу осаждают из фильтрата высаливанием сульфатом аммония, добавляя 390 *г* его на каж-

дый литр раствора. Через 6—8 *ч* осадок отделяют фильтрованием, переносят в диализатор и очищают фермент диализом против водопроводной воды в течение ночи. Осадок отделяют центрифугированием и высушивают при комнатной температуре.

Проведение опыта. К 20 мл 2%-ного раствора белка в воде, подщелоченной гидрокарбонатом натрия до pH 8,0, прибавляют 1 мл 0,1%-ного раствора препарата карбоксипептидазы. Раствор карбоксипептидазы готовят на воде, подщелоченной гидрокарбонатом натрия до pH 8,0, причем на каждые 100 мл раствора добавляют 4 капли диизопропилфторфосфата (ДФФ). Последний селективно ингибирует действие пептидпептидогидролаз (трипсина), присутствующих в препарате карбоксипептидазы. Так как диизопропилфторфосфат является сильнейшим ядом, его добавление к раствору фермента и дальнейшую работу с ферментом и инкубационной смесью проводят с применением специальных мер предосторожности (хорошая тяга, использование автоматических пипеток и т. п.). После добавления ДФФ к раствору фермента проверяют pH раствора и доводят его добавлением сухого гидрокарбоната натрия до pH 8,0. Инкубацию ведут при 37°С. К инкубационной смеси добавляют 1 мл толуола. Длительность инкубации и интервалы взятия проб устанавливают в предварительном опыте, так как интенсивность отщепления аминокислот при проведении данной работы зависит как от характера белка, взятого в качестве субстрата, так и от активности препарата карбоксипептидазы. Указанные величины могут варьировать в широких пределах. Всего за время проведения опыта берут не более 8 проб, по 2 мл каждая. Первую пробу берут сразу после добавления к субстрату фермента, последующие — через промежутки времени, устанавливаемые в специальном опыте.

В пробах осаждают белки добавлением десятикратного объема спирта, отделяют их центрифугированием, надосадочную жидкость упаривают досуха на водяной бане, сухой остаток растворяют в 0,5 мл 1%-ного раствора соляной кислоты и методом хроматографии распределения на бумаге выявляют число и характер аминокислот (с. 9), отщепившихся от белка под действием карбоксипептидазы через тот или иной промежуток времени. На основании полученных данных можно сделать приблизительный вывод о последовательности С-концевых аминокислот в молекуле исследуемого белка.

КОНЕЧНЫЕ ПРОДУКТЫ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА МОЧЕВИНУ

Оборудование, реактивы. Пробирки стеклянные химические; мочевина (5%-ная и 0,1%-ная); гипобромит натрия (см. приложение); уксусная кислота (ледяная); ксантгидрол (насыщ.) в метаноле (готовят перед употреблением; ксантгидрол получают путем восстановления спиртового щелочного раствора дибензо-γ-пирона цинковой пылью).

Разложение мочевины под действием гипобромита натрия

К 2—3 мл 5%-ного раствора мочевины приливают 1 мл свежеприготовленного раствора гипобромита натрия; мочевина разлагается:

$$H_2N-\underset{\underset{O}{\parallel}}{C}-NH_2 + 3NaBrO \longrightarrow N_2 + CO_2 + 3NaBr + 2H_2O$$

Эту реакцию применяют для количественного определения мочевины в моче.

Реакция мочевины с ксантгидролом

К 1 мл 0,1%-ного раствора мочевины прибавляют 2 мл ледяной уксусной кислоты и 0,5 мл насыщенного раствора ксантидрола в метаноле. После перемешивания и стояния в течение некоторого времени выпадают кристаллы диксантилмочевины:

$$2\ O\begin{matrix}\diagup C_6H_4 \diagdown \\ \diagdown C_6H_4 \diagup\end{matrix}CHOH + \begin{matrix}H_2N \\ H_2N\end{matrix}\!\!>C=O \longrightarrow$$

Ксантгидрол

$$O\begin{matrix}\diagup C_6H_4 \diagdown \\ \diagdown C_6H_4 \diagup\end{matrix}CH-NH-\underset{\underset{O}{\parallel}}{C}-NH-HC\begin{matrix}\diagup C_6H_4 \diagdown \\ \diagdown C_6H_4 \diagup\end{matrix}O + 2H_2O$$

Диксантилмочевина

Эта реакция также положена в основу одного из методов количественного определения мочевины.

ОТКРЫТИЕ КРЕАТИНА В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Оборудованне, реактнвы. Баня водяная; пробирки стеклянные хнмнческие; ступка (диаметр 110 мм); воронка стеклянная (днаметр 5—7 см); фильтры бумажные; свежепрепарнрованные мелко нарезанные мышцы лабораторных жнвотных; сульфосалицнловая кнслота (20%-ная); соляная кислота (10%-ная); пнкрнновая кнслота (насыщ.); гндроксид натрня (20%-ный).

Мелко нарезанные, только что отпрепарированные мышцы растирают в ступке с пятью объемами дистиллированной воды. От 3 до 5 мл полученной кашицы переносят в пробирку и осаждают белки равным объемом 20%-ной сульфосалициловой кислоты. Через несколько минут отфильтровывают осадок, берут небольшой объем фильтрата в пробирку, добавляют равный объем 10%-ной соляной кислоты и нагревают на кипящей водяной бане в течение 2 ч. Затем прибавляют в извлеченную из бани пробирку 1—2 мл

насыщенного раствора пикриновой кислоты и 2—3 мл 20%-ного раствора гидроксида натрия.

При нагревании на водяной бане креатин переходит в креатинин:

$$\begin{array}{c} NH_2 \\ | \\ HN{=}C \\ | \\ H_3C{-}N{-}CH_2{-}COOH \end{array} \longrightarrow \begin{array}{l} \quad NH{-}CO \\ \quad\ |\qquad\ | \\ HN{=}C\qquad | \\ \quad\ |\qquad\ | \\ H_3C{-}N{-}CH_2 \end{array} + H_2O$$

Последний взаимодействует с ациформой пикриновой кислоты, образуя с нею соль, окрашенную в ярко-оранжевый цвет:

$$\text{2,4-}(NO_2)_2C_6H_2(=O)(=N(\rightarrow O){-}OH) + \begin{array}{l} \quad NH{-}CO \\ HN{=}C\qquad | \\ H_3C{-}N{-}CH_2 \end{array} \xrightarrow{NaOH}$$

$$\text{2,4-}(NO_2)_2C_6H_2(=O)(=N(\rightarrow O){-}O^-) \quad \begin{array}{l} \quad NH{-}C{-}OH \\ H_2\overset{+}{N}{=}C\quad \| \\ H_3C{-}N{-}CH \end{array}$$

Пикрат креатинина

ФЕРМЕНТЫ

Ферментами (или энзимами) называют биологические катализаторы белковой природы, входящие в состав всех клеток и тканей живых организмов и ускоряющие течение отдельных химических реакций.

ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Источником выделения ферментов являются различные животные и растительные ткани, а также микроорганизмы. Из одних только плесневых грибов выделено около 80 различных ферментных препаратов: амилолитических, протеолитических и пектолитических. Свыше 140 ферментов получено в настоящее время в кристаллическом и высокоочищенном состоянии.

Ввиду того что ферменты являются белками и легко подвергаются денатурации, все операции при их выделении и очистке следует вести в мягких условиях при температуре не выше +4°С, лучше в холодной комнате. Так как ферменты легко инактивируются при значениях pH ниже 5 и выше 9, в процессе их выделения и особенно очистки необходимо тщательно контролировать величину водородного показателя. Используемые в работе с ферментами жидкие химические реактивы должны быть перегнаны, а сухие — перекристаллизованы. В связи с тем, что процедура выделения индивидуальных ферментов чрезвычайно сложна, часто работу ведут с так называемыми ферментными препаратами, представляющими собой лишь частично очищенные ферменты. При получении ферментных препаратов вытяжки из тщательно гомогенизированного биологического материала, содержащего в своем составе соответствующий фермент, обезвоживают тем или иным способом. Один из наиболее распространенных приемов обезвоживания препаратов с одновременным освобождением их от липидов является получение ацетоновых порошков, для чего вытяжку фермента или тканевой гомогенат обрабатывают охлажденным (до —20°С) ацетоном, взятым в большом избытке. Ацетоновые порошки, приготов-

ленные с соблюдением отмеченных выше условий, могут храниться в эксикаторе при 0°С без потери активности в течение длительного времени и использоваться по мере надобности. К новейшим методам обезвоживания следует отнести лиофилизацию препаратов в специальных приборах, а также использование для этой цели сефадекса. Для получения чистых препаратов ферментов широко используют такие эффективные методы, как электрофорез, гель-фильтрацию через сефадексы, ионообменную хроматографию и др. Одним из способов сохранения активности ферментов в течение длительного времени является получение их в иммобилизованном состоянии.

ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА САХАРАЗЫ (β-D-ФРУКТОФУРАНОЗИД — ФРУКТОГИДРОЛАЗА; КФ 3.2.1.26)

Оборудование, реактивы. Центрифуга; термостат; баня водяная; ступка фарфоровая; пластинка стеклянная; пробирки стеклянные химические; дрожжи пекарские; песок кварцевый; тимол; ацетон; сахароза (5%-ная); фелингова жидкость (см. приложение).

100 г пекарских дрожжей тщательно растирают в ступке с кварцевым песком. Растертую массу наносят тонким слоем на стекло и высушивают в токе сухого воздуха. Высушенные дрожжи растирают в порошок. Для извлечения сахаразы к полученному порошку приливают небольшими порциями 200 мл воды при постоянном перемешивании. Затем массу вновь растирают в фарфоровой ступке и центрифугируют в течение 10 мин при 3000 *g* (или фильтруют через складчатый фильтр). Прозрачный фильтрат упаривают в вакууме при 35°С до небольшого объема и выливают в пятикратный объем охлажденного до —20°С ацетона, перемешивают и через несколько минут центрифугируют при 3000 *g*. Образовавшийся осадок высушивают при температуре 38°С и растирают в ступке в порошок. Полученный препарат сахаразы длительно сохраняется. В качестве антисептика к порошку добавляют кристаллик тимола, завернутый в фильтровальную бумагу. Для проверки активности сахаразы в две пробирки наливают по 0,5 мл 0,01%-ного водного раствора препарата.

Содержимое одной из них кипятят в течение 3 мин для разрушения фермента, после чего пробирку охлаждают. Затем в обе пробирки добавляют по 3 мл 5%-ного раствора сахарозы и ставят в водяную баню при 40°С на 10—15 мин. По истечении указанного времени в обе пробирки добавляют по 2 мл фелинговой жидкости, перемешивают и нагревают до начинающегося кипения. В контрольной пробирке (фермент разрушен кипячением) осадка оксида меди (I) не появляется. В пробирке с активным ферментом образуется красный осадок оксида меди (I), что указывает на присутствие восстанавливающих ионы меди в степени окисления +2 глюкозы и фруктозы, образующихся при гидролизе невосстанавливающего ее дисахарида — сахарозы.

ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА УРЕАЗЫ (КАРБАМИДАМИДОГИДРОЛАЗА; КФ 3.5.1.5) ИЗ СОЕВОЙ МУКИ

Оборудованне, реактивы. Мельннца кофейная; воронка Бюхнера; ступка фарфоровая; колба конническая на 500 мл; колба для фильтровання под вакуумом; трубка резнновая с зажнмом; бобы сон; петролейный (нлн серный) эфнр; мочевина (1%-ная); фенолфталенн (1%-ный спнртовой); гидроксид натрия (10%-ный); реактнв Несслера (см. приложенне).

100 г сухих бобов сои дважды размалывают на кофейной мельнице и тщательно растирают в ступке. Муку всыпают в коническую (500 мл) колбу и встряхивают в течение 10—15 мин с 200 мл петролейного (или диэтилового) эфира для обезжиривания *(колбу не закрывать пробкой, беречь от огня!)*. Осадок отделяют на воронке Бюхнера. Экстракцию эфиром повторяют 5—6 раз. Обезжиренную муку высушивают, распределяя ее тонким слоем на стекле или фильтровальной бумаге. Высушенную, обезжиренную муку хранят в банке с притертой пробкой, предпочтительно в сухом месте. Она может долго служить для получения активных вытяжек уреазы.

20—30 г обезжиренной соевой муки настаивают с пятикратным количеством дистиллированной воды в течение 15—20 ч при температуре не выше 5°С. Осадок отделяют центрифугированием при 3000 *g*. Надосадочную жидкость упаривают в вакууме досуха при температуре 35—40°С. Полученный порошок хорошо растворим в воде.

Для проверки активности уреазы готовят 0,01%-ный раствор препарата. В пробирку наливают 5 мл 1%-ного раствора мочевины, 2—3 капли спиртового раствора фенолфталеина и 1—2 мл 0,01%-ного раствора уреазы. Пробирку помещают в термостат при 38°С на 30 мин. Параллельно ставят такой же опыт с прокипяченным раствором уреазы. Содержимое первой пробирки становится малиново-красным вследствие смещения реакции среды в щелочную область в результате образования аммиака. Образование аммиака можно обнаружить и иным путем. С этой целью повторяют опыт и после инкубации при 38°С в реакционную смесь осторожно добавляют равный объем 10%-ного раствора гидроксида натрия. Выделение аммиака обнаруживают по запаху, по посинению влажной лакмусовой бумажки у отверстия пробирки, а также по образованию красно-бурого осадка при добавлении 2—3 капель реактива Несслера.

Гидролиз мочевины, катализируемый уреазой, приводит к образованию оксида углерода (IV) и аммиака:

$$H_2N-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-NH_2+H_2O \xrightarrow{\text{Уреаза}} 2NH_3\uparrow+CO_2\uparrow$$

При обнаружении аммиака реактивом Несслера реакция выражается следующей схемой:

$$2K_2\left[HgI_4\right] + 3KOH + NH_3 \rightleftharpoons \left[O\begin{smallmatrix}Hg\\ \\ Hg\end{smallmatrix}\overset{+}{N}H_2\right]I^- + 7KI + 2H_2O$$

ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ (ЦИТОХРОМ С : O_2-ОКСИДОРЕДУКТАЗА; КФ 1.9.3.1) ИЗ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Оборудование, реактивы. Гомогенизатор; воронка стеклянная; ножницы; марля; бумага фильтровальная; мышечная ткань; реактив Нади (см. приложение).

Скелетные мышцы, освобожденные от жировой ткани (~50—80 г), тщательно измельчают ножницами, заливают четырехкратным объемом дистиллированной воды и гомогенизируют в течение 10 мин. Гомогенат фильтруют через двойной слой марли и многократно промывают твердый остаток водой до тех пор, пока промывные воды перестанут быть окрашенными. Полученная почти бесцветная кашица содержит цитохромоксидазу, комплекс цитохромов и некоторые дегидрогеназы. Для обнаружения цитохромоксидазной активности к небольшому количеству промытой кашицы, помещенной на фильтровальную бумагу, добавляют 0,1—0,2 мл реактива Нади. Спустя несколько минут после добавления реактива появляется ярко-синее окрашивание, обусловленное образованием индофенолового голубого. Параллельно ставят контрольную пробу с прогретой при 60—70°С в течение 5 мин и затем охлажденной мышечной кашицей. Цитохромоксидаза прочно связана с митохондриями клетки, поэтому при извлечении ее из мышечной ткани она вместе с цитохромами остается в нерастворимом остатке.

Для обнаружения действия цитохромоксидазы используется реакция окисления некоторых аминов и фенолов (парафенилендиамина, гидрохинона, пирокатехина и др.) кислородом в присутствии этого фермента. Например, щелочной раствор α-нафтола и N,N-диметилпарафенилендиамина (реактив Нади) легко окисляется с образованием индофенолового голубого:

$$(H_3C)_2N-C_6H_4-NH_2 + C_{10}H_7OH + O_2 \rightarrow (H_3C)_2N-C_6H_4-N=C_{10}H_6=O + 2H_2O$$

Индофеноловый голубой

ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА АМИЛАЗ ИЗ ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ (ПО ФЕНИКСОВОЙ)

Оборудование, реактивы. Термостат; баня водяная; воронка стеклянная; цилиндр измерительный с носиком на 50 мл; пластинка фарфоровая; колба коническая (Эрленмейера) на 100 мл; пробирки стеклянные химические; плесневый порошок; крахмал (1%-ный); иод (0,3%-ный) в иодиде калия (3%-ном).

Культивирование плесневых грибов. Плесневые грибы развиваются на синтетических питательных средах с небольшим числом компонентов. Состав одной из них (среда Чапека) таков: сахароза — 3 г, $NaNO_3$—0,2 г, KH_2PO_4—0,1 г, $MgSO_4$—0,05 г, KCl—0,05 г, $FeSO_4$ (или $Fe_2(SO_4)_3$) — 0,001 г, вода до 100 мл (pH 7).

Для получения грибной массы вносят кусочек плесени непосредственно с заплесневевшего предмета (или пользуются чистой культурой гриба Aspergillus niger) в питательную среду Чапека. Колбу помещают в термостат при температуре 25—28°С. Через 5—6 дней на поверхности жидкости вырастает мощная пленка гриба, вполне пригодная для выделения амилазы.

Получение препарата грибных амилаз. Грибную массу отделяют от среды фильтрованием, распределяют ее небольшими кусочками на поверхности стекла и высушивают при температуре 37°С. Воздушно-сухую массу затем тщательно растирают в фарфоровой ступке с трехкратным количеством кварцевого песка. Полученный тонкий однородный порошок используют для проведения опытов с амилазой.

Обнаружение действия грибных амилаз. 2 г полученного препарата плесневых грибов смешивают с 50 мл воды, нагретой до 37°С, энергично встряхивают в течение 5 мин а затем настаивают 2 ч при той же температуре. После повторного встряхивания твердый остаток отфильтровывают. В фильтрате содержится комплекс грибных амилаз. В пробирку наливают 5 мл полученного фильтрата, прибавляют 10 мл 1%-ного раствора крахмала, быстро перемешивают и тотчас же одну каплю содержимого пробирки, извлеченную стеклянной палочкой, смешивают на фарфоровой пластинке с 1—2 каплями раствора иода в иодиде калия. Проба окрашивается в интенсивно синий цвет. Пробирку помещают в водяную баню, нагретую до 40°С. Через каждые 2 мин повторяют взятие проб. По мере расщепления крахмала пробы с иодом будут окрашиваться в различные цвета — синий, фиолетовый, красный и, наконец, желтый, вследствие образования декстринов разной степени сложности.

Ферменты амилазного комплекса ускоряют гидролиз крахмала с образованием разнообразных промежуточных и конечных продуктов (см. учебник, с. 154 и 404—406). В препарате грибных амилаз содержится в основном α-амилаза. О степени гидролиза ею крахмала можно судить по изменению окраски крахмала и декстринов с иодом. Амилоза, присутствующая в крахмале, дает синее окраши-

вание с иодом; амилодекстрины (молекулярная масса ~ 10 000) — сине-фиолетовое; эритродекстрины (относительная молекулярная масса от 4000 до 6000) — красно-бурое; ахродекстрины (относительная молекулярная масса около 3700) — почти никакого окрашивания и, наконец, мальтодекстрины (относительная молекулярная масса около 1000) совершенно не окрашиваются иодом.

ОЧИСТКА ФЕРМЕНТОВ

ОЧИСТКА ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТ-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ (D-ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТ: НАДФ — ОКСИДОРЕДУКТАЗА; КФ 1.1.1.49)

Оборудование, реактивы. Центрифуга рефрижераторная; термостат; установка для гельфильтрации с колонкой диаметром 5 мм и высотой 200 мм; коллектор фракций; спектрофотометр; секундомер; пипетки с одной меткой на 0,1; 1,0 и 2,0 мл (по 2 шт.); стаканы стеклянные лабораторные на 500 мл (2 шт.); бумага фильтровальная; сетка проволочная; дрожжи пивные; гидрокарбонат натрия (0,1 *M*); сульфат аммония (тонко-измельченный); гель фосфата кальция (см. приложение); буфер фосфатный (0,1 *M*), pH 7,5; буфер ацетатный (0,1 *M*), pH 4,5; буфер глицил-глициновый (0,07 *M* и 0,25 *M*), pH 7.5; двунатриевая соль глюкозо-6-фосфата (0,04 *M*); никотинамидадениндинуклеотидфосфат (0,03 *M*; 25 мг НАДФ растворяют в 1 мл $NaHCO_3$ 1%-ного); триэтаноламин (0,5 *M*), pH 7,5, содержащий 0,005 *M* этилендиаминотетраацетата; сефадекс марки G-50; ацетат бария (1 *M*).

Наряду с другими методами очистки ферментов (см. учебник, с. 224) широко используется метод избирательной адсорбции их на гелях фосфата кальция и гидроксида алюминия с последующей элюцией. В некоторых случаях при обработке адсорбентом фермент остается в растворе, а адсорбируются балластные белки. Наибольший эффект получают при сочетании того и другого вариантов адсорбции. Адсорбцию проводят в слабокислой среде (pH 5—6) и при достаточно низкой концентрации солей в растворе. Обычно гель добавляют к раствору фермента до получения однородной суспензии. Степень адсорбции фермента контролируют путем определения его активности в надосадочной жидкости. Эмпирически подбирают такое соотношение объемов геля и ферментного раствора, при котором в надосадочной жидкости остается около 90% первоначальной ферментативной активности при адсорбции балластных белков и около 10% — при адсорбции очищаемого фермента гелем. Если адсорбируются балластные белки, то осадок отбрасывают, и, наоборот, при адсорбции фермента, гель собирают и подготавливают для элюции с него фермента. Перед элюцией гель промывают несколько раз водой или слабым буферным раствором. Элюцию обычно осуществляют слабощелочным буферным раствором с непрерывным контролем ферментативной активности

в элюате. Очистку фермента вышеописанным способом можно осуществлять и в колонке, которую заполняют соответствующим адсорбентом. В этом случае сбор фракций при элюции фермента соответствующим буферным раствором ведут с помощью автоматического коллектора, используя для дальнейшей работы те из них, где наблюдается наибольшая ферментативная активность.

Подготовка биологического материала. Прессованные пивные дрожжи мелко крошат на фильтровальную бумагу, помещенную на проволочную сетку, и сушат при комнатной температуре. Высушенные дрожжи измельчают и хранят в плотно закрытых склянках в холодильнике.

Экстракция фермента. 100 г высушенных дрожжей помещают в химический стакан, заливают 300 мл 0,1·М раствора гидрокарбоната натрия и ставят в термостат при температуре 40°С на 5—6 ч, изредка помешивая. Через указанный промежуток времени центрифугируют при 13 000 *g* и температуре от 0 до —2°С в течение 1 ч.

Адсорбция и элюция фермента. Полученный после центрифугирования осадок отбрасывают, а к надосадочной жидкости добавляют гель фосфата кальция при постоянном помешивании до получения однородной суспензии. Суспензию центрифугируют при 3000 *g* в течение 15 мин, супернатант отбрасывают. Элюцию фермента с геля (осадка) ведут 0,1 *М* раствором фосфатного буфера (рН 7,5), которого берут в два раза больше, чем было исходного экстракта фермента. После тщательного перемешивания смесь центрифугируют при 3000 *g* в течение 15 мин и осадок отбрасывают.

Фракционирование фермента сульфатом аммония. К надосадочной жидкости при постоянном помешивании в течение 10—15 мин небольшими порциями добавляют сульфат аммония из расчета 33,5 г на каждые 100 мл. Спустя 40 мин смесь центрифугируют в течение 15 мин при 13 000 *g*. Осадок отбрасывают, а к супернатанту добавляют еще по 6 г сульфата аммония на каждые 100 мл раствора. После растворения сульфата аммония смесь выдерживают в течение 30 мин при периодическом помешивании, после чего вновь центрифугируют 15 мин при 25 000 *g*. Полученную надосадочную жидкость еще раз обрабатывают сульфатом аммония, беря 12 г его на каждые 100 мл ее и вновь центрифугируют в течение 20 мин при 25 000 *g*. Обычно ферментативная активность в основном сосредоточена в последнем осадке, который медленно растворяют в 80—90 мл холодной бидистиллированной воды. Из полученного раствора фермент осаждают пятикратным объемом 0,1 *М* ацетатного буфера (рН 4,5). Смесь оставляют на 25 мин при 0°С, после чего суспензию центрифугируют 10 мин при 13 000 *g*. Надосадочную жидкость отбрасывают, а осадок растворяют в 10 мл 0,25 *М* глицил-глицинового буфера (рН 7,5). Фермент либо сохраняют в этом растворе в замороженном состоянии при — 16°С, либо лиофилизируют. Выход фермента составляет примерно

20% от его содержания в исходном дрожжевом экстракте. Удельная активность в процессе очистки повышается в 12—15 раз.

Определение активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы. Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа ускоряет реакцию: глюкозо-6-фосфат + НАДФ$^+$ $\rightleftharpoons$ 6-фосфоглюконат + НАДФ · Н + Н$^+$.

Образование НАДФ · Н является мерилом активности фермента, что прослеживают по адсорбции света при 340 или 366 нм. Измерение ведут при рабочей длине кюветы 1 см и температуре 25°С. Увеличение экстинкции при 366 нм не должно превышать 0,03 за 1 мин.

В кювету спектрофотометра отмеряют последовательно пипеткой: 1,9 мл 0,5 М раствора триэтаноламина, 1 мл раствора фермента, 0,05 мл раствора НАДФ. Смесь хорошо перемешивают стеклянной палочкой и выдерживают 5 мин при 25 °С, после чего добавляют 0,05 М раствора глюкозо-6-фосфата и выжидают увеличения экстинкции (E) на 0,02. Включают секундомер и в течение 10 мин измеряют экстинкции раствора через каждые 2 мин. Полученные отсчеты прироста экстинкции за каждые 2 мин суммируют и делят на 2, в результате чего получают E/мин. За единицу принимается количество фермента в 1 мл раствора, которое за 1 мин при 25°С обеспечивает прирост экстинкции НАДФ · Н при 340 нм на 0,001.

На основании полученных данных рассчитывают количество фермента в 1 мл раствора.

Очистка глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы от примеси сульфата аммония методом гель-фильтрации на сефадексах. Колонку заполняют сефадексом (G-50) в 0,07 М глицил-глициновом буфере (рН 7,5; подготовка сефадекса и заполнение колонки указаны на с. 43). На поверхность сефадекса наносят 0,2 мл раствора фермента (0,1 — — 0,15 мг белка). Элюцию ведут тем же буферным раствором со скоростью 0,1 мл в 1 мин. Фракции элюата объемом по 0,4 мл собирают при помощи коллектора фракций. Наличие сульфат-ионов определяют путем осаждения их ионами бария, для чего каплю исследуемой фракции, снятой с колонки, добавляют к 0,5 мл 1 М раствора ацетата бария. Появление при этом мути указывает на наличие сульфата аммония. Одновременно во фракциях определяют содержание белка по методу Лоури (с. 75). Полученные экспериментальные данные наносят на график, откладывая по оси абсцисс номера фракций, снятых с колонки, а по оси ординат — количество найденного в них белка и сульфата аммония. Так как последний определялся качественно, то его наличие во фракциях отмечают короткими заштрихованными столбиками. Убеждаются, что фермент и сульфат аммония вышли из адсорбционной колонки в различных и далеко отстоящих друг от друга фракциях.

КАЧЕСТВЕННЫЕ ПРОБЫ НА ПРИСУТСТВИЕ ФЕРМЕНТОВ

ОТКРЫТИЕ ДЕЙСТВИЯ ПЕПСИНА (ПЕПТИД-ПЕПТИДОГИДРОЛАЗА; КФ 3.4.4.1)

Оборудование, реактивы. Термостат; секундомер; пипетки градуированные на 1 мл и 5 мл; пробирки стеклянные химические; профильтрованный желудочный сок; смесь молочноацетатная, состоящая из равных объемов свежего молока и 0,1 М ацетатного буфера; буфер ацетатный (0,1 М, pH 5).

В пробирку наливают 5 мл молочноацетатной смеси и помещают ее в термостат при температуре 25°С. После того как пробирка прогреется до указанной температуры, в нее добавляют 0,1 мл профильтрованного желудочного сока. Перемешивают содержимое пробирки и одновременно включают секундомер, следуя за моментом появления на стенке пробирки первых сгустков казеина. Этот момент, свидетельствующий о завершении реакции перехода растворимого казеиногена в нерастворимый казеин под действием протеолитического фермента — пепсина, отмечают по секундомеру.

ОТКРЫТИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ (ДОНОР: H_2O_2 — ОКСИДОРЕДУКТАЗА; КФ 1.11.1.7.) В ХРЕНЕ

Оборудование, реактивы. Штатив лабораторный с пробирками; пипетки с одной меткой на 1 мл (3 шт.); экстракт хрена водный (корень хрена натирают на терке и настаивают с небольшим количеством воды в течение 1 ч, после чего фильтруют); гваяковая смола (5%-ная спиртовая); пероксид водорода (0,5%-ный); бензидин; реактив Нади (см. приложение).

Качественная проба с гваяковой смолой. К 1 мл водного экстракта хрена добавляют 1—2 капли свежеприготовленного 5%-ного спиртового раствора гваяковой смолы. При добавлении к смеси 1—2 капель 0,5%-ного раствора пероксида водорода появляется ярко-синее окрашивание, которое не возникает при добавлении прокипяченной пробы препарата.

Качественная проба с реактивом Нади. К 1 мл водного экстракта хрена добавляют 2—3 капли свежеприготовленного реактива Нади и затем 1—2 капли 0,5%-ного раствора пероксида водорода. Тотчас возникает интенсивное синее окрашивание, обусловленное образованием индофенолового голубого (с. 124). Опыт с прокипяченным экстрактом хрена дает отрицательный результат.

Бензидиновая проба. К 1 мл водного экстракта хрена добавляют 5 капель спиртового раствора бензидина и затем 2 капли 0,5%-ного раствора пероксида водорода. Возникает темно-

синее окрашивание вследствие окисления бензидина в *п*, *п'*-дииминодифенилхинон:

$$H_2N-C_6H_4-C_6H_4-NH_2 + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Пероксидаза}} HN=C_6H_4=C_6H_4=NH + 2H_2O$$

п, п'-Диаминодифенил *п, п'-Дииминодифенилхинон*

ОТКРЫТИЕ АМИЛАЗЫ В СЛЮНЕ

Оборудование, реактивы. Баня водяная; пластинка фарфоровая; воронка стеклянная; колба коническая на 100 мл; цилиндр измерительный с носиком на 50 мл; стаканы стеклянные лабораторные на 100 мл (2 шт.); клейстер крахмальный (1%-ный); иод (1%-ный) в иодиде калия (3%-ном); фелингова жидкость (см. приложение).

Приготовление разбавленной слюны. Рот ополаскивают 2—3 раза водой для удаления остатков пищи. Отмеряют цилиндром 50 мл дистиллированной воды и ополаскивают ею рот в течение 3—5 мин в несколько приемов. Собранную жидкость (примерно 50—60 мл) фильтруют через вату и фильтрат используют для работы.

Гидролиз крахмала под действием амилазы слюны. В две пробирки наливают по 5 мл крахмального клейстера и в одну из них — 5 мл воды, а в другую — 5 мл раствора слюны. Обе пробирки со стеклянными палочками, погруженными в них, одновременно помещают в водяную баню при 40°С. Через 1 мин от каждой смеси отбирают с помощью стеклянной палочки по капле жидкости и смешивают их по отдельности с каплей иода, заранее нанесенной на пластинку. Повторяют взятие проб через 2, 4, 6 и 8 мин. Окраска с иодом проб из пробирки, содержащей слюну, меняется от синей к сине-фиолетовой, буро-красной, красной и, наконец, желтой (с. 126).

К содержимому пробирки со слюной добавляют 1—2 мл фелинговой жидкости и смесь нагревают до начала кипения. Образуется красный осадок оксида меди (I) за счет восстановления гидроксида меди (II) образовавшимися мальтозой и низкомолекулярными декстринами. Контрольная проба в тех же условиях не восстанавливает гидроксид меди (II) в оксид меди (I).

ОТКРЫТИЕ ЛИПАЗЫ (ГИДРОЛАЗА ЭФИРОВ ГЛИЦЕРИНА; КФ 3.1.1.3) В СЕМЕНАХ КЛЕЩЕВИНЫ

Оборудование, реактивы. Ступка фарфоровая диаметром 90 мм; цилиндр измерительный с носиком на 50 мл; бюретка прямая с краном на 25 мл; колба коническая на 100 мл; пипетки с одной меткой на 2 мл и 5 мл; семена клещевины; масло вазелиновое; буфер фосфатный (0,2 М; рН 4,8); спирт этиловый (96%-ный); диэтиловый эфир; фенолфталеин (1%-ный спиртовой раствор); гидроксид калия (0,1 н.).

0,2 г очищенных семян клещевины тщательно растирают в фарфоровой ступке, после чего к растертой массе примешивают 3 мл вазелинового масла и 2 мл 0,2 М фосфатного буфера (pH 4,8). Смесь инкубируют 30 мин, добавляют 30 мл 96%-ного спирта и 15 мл эфира. Тщательно перемешивают, после чего смесь сливают в колбу, на 100 мл добавляют 2—3 капли раствора фенолфталеина и отщепившиеся жирные кислоты оттитровывают 0,1 н. раствором гидроксида калия (*все горелки в лаборатории должны быть выключены!*). В качестве контроля используют смесь без инкубации. Разница в количестве пошедшей на титрование 0,1 н. щелочи в опытной и контрольной пробах является показателем активности липазы.

ОТКРЫТИЕ УРЕАЗЫ (КАРБАМИД-АМИДОГИДРОЛАЗА; КФ 3.5.1.5) В СОЕВОЙ МУКЕ

Оборудование, реактивы. Термостат; пипетки с одной меткой на 2 мл (2 шт.); соевая мука (с. 123); мочевина (1%-ная); фенолфталеин (1%-ный спиртовой раствор).

К 2 мл 1%-ного раствора мочевины добавляют две капли фенолфталеина и 2 мл раствора уреазы (1 : 10). Смесь хорошо перемешивают и ставят в термостат при 38°С на 30 мин. Параллельно ставят такой же опыт с прокипяченным раствором уреазы. Содержимое первой пробирки становится малиново-красным вследствие смещения pH раствора в щелочную зону за счет образовавшегося аммиака (с. 123).

ОТКРЫТИЕ АЛЬДЕГИДОКСИДАЗЫ (АЛЬДЕГИД: O_2 — ОКСИДОРЕДУКТАЗА; КФ 1.2.3.1) В СЫРОМ МОЛОКЕ

Оборудование, реактивы. Баня водяная; термометр лабораторный; пипетки с одной меткой на 1 мл (3 шт.), 5 мл (2 шт.); свежее коровье молоко; масло вазелиновое; формальдегид (0,4%-ный); метиленовый синий (0,01%-ный).

В три пробирки наливают по 5 мл свежего коровьего молока. Одну пробу кипятят в течение 2—3 мин и остужают. В прокипяченную пробу и в одну из некипяченых проб добавляют по 1 мл 0,4%-ного раствора формальдегида, а в другую некипяченую — 1 мл воды. Затем во все три пробирки приливают по 1 мл 0,01%-ного раствора метиленового синего. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и заливают в каждую по 3—4 капли вазелинового масла для предохранения жидкости от соприкосновения с кислородом воздуха. Все пробы помещают в водяную баню, нагретую до 40°С. Через некоторое время жидкость в некипяченой пробе, со-

держащей субстрат, - обесцвечивается за счет образования восстановленной формы метиленового синего:

Cl^- — Альдегидоксидоза — Cl^-

ФАД·H_2 ФАД

Метиленовый синий (окрашенная, окисленная форма)[1] *Метиленовый синий (бесцветная, восстановленная форма)*[2]

Если бесцветный раствор метиленового синего встряхнуть на воздухе, то раствор вновь приобретает синий цвет:

$$MC{\cdot}H_2 + O_2 \rightarrow MC + H_2O_2.$$

Вследствие отсутствия активного фермента в первой прокипяченной и субстрата в одной из некипяченых проб обесцвечивания метиленового синего в них не происходит.

ОТКРЫТИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ (ДОНОР: H_2O_2 — ОКСИДОРЕДУКТАЗА; КФ 1.11.1.7) В КАРТОФЕЛЕ

Оборудование, реактивы. Терка; сырой картофель; пирогаллол (1%-ный) пероксид водорода (2%-ный).

Картофель натирают на терке. Небольшое его количество, не отжимая, переносят в пробирку, добавляют 1—2 мл 1%-ного раствора пирогаллола и 1—2 капли 2%-ного раствора пероксида водорода. При стоянии выпадает желто-бурый осадок пурпурогаллина. Образование пурпурогаллина выражает следующая схема:

Окисление → *Окисление* → *Окисление, перегруппировка* → *Окисление; декарбоксилирование* → $+CO_2$

Пурпурогаллин (триоксибензо-α,β-трополон)

Многократное дегидрирование (окисление) пирогаллола и ряда промежуточных продуктов на пути к пурпурогаллину осуществляется с участием пероксидазы, каждый раз передающей снятые атомы водорода на пероксид водорода.

---

[1] Сокращенное обозначение — МС.

[2] Сокращенное обозначение — МС·H_2.

ОТКРЫТИЕ ТИРОЗИНАЗЫ (о-ДИФЕНОЛ: O_2 — ОКСИДОРЕДУКТАЗА; КФ 1.10.3.1) В КАРТОФЕЛЕ

Оборудование, реактивы. Баня водяная; терка; воронка Бюхнера с наружным диаметром 100 мм; пипетка с одной меткой на 1 мл; марля; картофель сырой; тирозин (насыщ.).

Картофель натирают на терке, отжимают через несколько слоев марли и полученный экстракт немедленно фильтруют на воронке Бюхнера. В пробирку наливают 1 мл экстракта, 2—3 капли раствора тирозина, перемешивают и помещают пробирку в водяную баню, нагретую до 40° С. Время от времени пробирку встряхивают для лучшего соприкосновения жидкости в пробирке с воздухом. Окраска смеси становится розово-красной, затем бурой и через 1—2 ч черной, так как под действием тирозиназы (монофенолоксидазы) тирозин превращается через окрашенные в красный цвет промежуточные продукты в черный азотсодержащий пигмент — меланин:

HO–C_6H_4–CH_2–CH(NH_2)–COOH → *Окисление* → (HO)$_2$$C_6H_3$–$CH_2$–CH($NH_2$)–COOH

Тирозин → *3,4-Диоксифенилаланин („Дофа")*

3,4-Диоксифенилаланин („Дофа") → *Окисление* → *„Дофа"-хинон* (O=C_6H_3(=O)–CH_2–CH(NH_2)–COOH)

3,4-Диоксифенилаланин („Дофа") → *Окисление и замыкание цикла* → *3,4-Дигидро-5,6-диокси-β-индолилкарбоновая кислота*

„Дофа"-хинон → *Окисление и замыкание цикла* → *2,3-Дигидро-5,6-дикето-β-индолилкарбоновая кислота (пигмент красного цвета)*

3,4-Дигидро-5,6-диокси-β-индолилкарбоновая кислота → *Окисление* → *2,3-Дигидро-5,6-дикето-β-индолилкарбоновая кислота*

2,3-Дигидро-5,6-дикето-β-индолилкарбоновая кислота → *Меланохром* → *Меланин (пигмент черного цвета)*

ОБНАРУЖЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ В ГРЕНЕ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА МЕТОДОМ ЭНЗИМЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Метод энзимэлектрофореза включает два основных этапа: электрофоретическое фракционирование белков в соответствующем геле; выявление ферментативной активности отдельных белковых

фракций непосредственно на гелевых колонках с помощью химических реакций, протекающих в специально подготовленных инкубационных средах. Первый этап энзимэлектрофореза, а именно электрофоретическое фракционирование белков на колонках полиакриламидного геля, проводится в соответствии с приведенной выше прописью (с. 51). Второй этап, т. е. выявление каталитической активности белковых фракций, осуществляется специфическим для каждого фермента способом. Ниже приведены несколько конкретных прописей для выявления тех или иных ферментов. Работы по обнаружению ферментов методом энзимэлектрофореза удобно ставить на грене тутового шелкопряда.

ОБНАРУЖЕНИЕ ЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ РАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ ТКАНЕЙ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

Оборудование, реактивы. Центрифуга рефрижераторная; приборы и реактивы для проведения электрофореза в полиакриламидном геле (с. 51); ступка фарфоровая; пробирки стеклянные с притертыми пробками на 2 мл (4 шт.); пипетки с одной меткой на 1, 2, 5 и 10 мл; штатив лабораторный с пробирками; грена тутового шелкопряда (зимующая); жидкий азот (или сухой лед); песок кварцевый; приборы и реактивы для определения белка по методу Лоури (с. 75); *трис*-глициновый буферный раствор (pH 8,3), разбавленный в 5 раз; α-нафтилацетат (1%-ный) в ацетоне (50%-ном); 0,2 М *трис*-HCl буфер (pH 7,1); раствор прочного синего В (2 мг в 1 мл).

100 мг грены тутового шелкопряда тщательно растирают в фарфоровой ступке при очень сильном охлаждении (жидким азотом или сухим льдом). К растертой массе добавляют небольшое количество кварцевого песка (на кончике скальпеля) и 1 мл охлажденного *трис*-глицинового буферного раствора (pH 8,3), разбавленного в 5 раз, и продолжают растирание в течение 10—15 мин при 0°С. Гомогенат переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют в интервале температур от 0 до −2 °С в течение 15 мин при 13 000 *g*. Надосадочную жидкость осторожно сливают в небольшую пробирку и определяют в ней содержание белка по методу Лоури (стр. 75). На основании полученных данных раствор разбавляют тем же буфером до содержания белка в 4000—5000 мкг/мл.

Колонки полиакриламидного геля готовят в соответствии с прописью, приведенной ранее (с. 52). На каждую колонку наносят по 0,1 мл белкового экстракта и проводят электрофоретическое фракционирование белков по методу, описанному выше (с. 55).

По завершении электрофореза гелевую колонку, извлеченную из стеклянной трубочки с помощью шприца или стальной струны, промывают дистиллированной водой и помещают в заранее подготовленную инкубационную смесь, состоящую из 9 мл 0,2 М *трис*-HCl буферного раствора (pH 7,1) и 0,5 мл 1%-ного раствора α-нафтилацетата в 50%-ном ацетоне. Смесь тщательно перемешивают и оставляют на 10 мин в термостате при 37°С. Затем приливают 1 мл раствора прочного синего В, перемешивают и выдерживают смесь в термостате еще 10—20 мин. Белковые фракции, обладающие

эстеразной активностью, выявляются на колонке в виде зон, окрашенных в коричневый цвет (от 2 до 6 фракций). Окраска развивается в результате реакции сочетания между α-нафтолом, освобождающимся при гидролизе субстрата (α-нафтилацетата) в присутствии эстеразы, и солью диазония (прочным синим В) с образованием нерастворимого азосоединения.

ОБНАРУЖЕНИЕ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ (ФОСФОГИДРОЛАЗА МОНОЭФИРОВ ОРТОФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ; КФ 3.1.3.2)

Оборудование, реактивы те же, что и в работе на странице 134, за исключением реактивов, предназначенных для приготовления инкубационной смеси, а именно: α-нафтилфосфат (0,3%-ный); ацетатный буфер (0,2 М; рН 4,8); прочный синий В (2 мг в 1 мл.)

Получение белкового экстракта из грены и электрофорез в полиакриламидном геле проводят в соответствии с прописью, приведенной в предыдущей работе.

Гелевую колонку, промытую дистиллированной водой, помещают в заранее подготовленную инкубационную смесь, составленную из 8 мл 0,2 М ацетатного буфера (рН 4,8) и 1 мл 0,3%-ного раствора α-нафтилфосфата. После тщательного перемешивания смесь инкубируют в течение 10 мин в термостате при температуре 37°С. Далее приливают 1 мл раствора прочного синего В, перемешивают и снова выдерживают 20 мин в термостате до появления малиново-красных полос в местах локализации кислой фосфатазы на гелевой колонке.

В процессе инкубации происходит реакция сочетания между α-нафтолом, освобождающимся при гидролизе α-нафтилфосфата (субстрат) в присутствии кислой фосфатазы, и солью диазония с образованием азосоединения, окрашенного в малиново-красный цвет. В экстракте грены обычно обнаруживают от 2 до 6 форм кислой фосфатазы.

Аналогично можно выявить на гелевой колонке и щелочную фосфатазу, заменив лишь кислый буферный раствор на щелочной (рН 8,1) и α-нафтилфосфат на β-нафтилфосфат.

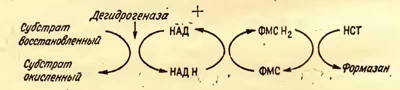
ВЫЯВЛЕНИЕ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТ-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ D-ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТ: НАДФ — ОКСИДОРЕДУКТАЗА; КФ 1.1.1.49)

Оборудование, реактивы те же, что перечислены на странице 134, за исключением реактивов, предназначенных для приготовления инкубационной смеси, а именно: двунатриевая соль глюкозо-6-фосфата (0,25 М); НАДФ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат (1 мг в 3 мл воды); НСТ — нитротетразолиевый синий (2 мг в 1 мл воды); ФМС — феназинметосульфат (0,2 мг в 1 мл, воды); *трис*-HCl буферный раствор (0,5 М; рН 7,1).

Получение белкового экстракта из грены и электрофорез белков проводят в соответствии с прописью, приведенной на странице 134.

Гелевую колонку, извлеченную из стеклянной трубки, промывают дистиллированной водой и помещают в инкубационную среду, содержащую 6 мл 0,5 М *трис*-HCl буферного раствора (pH 7,1), а также 1 мл раствора НАДФ$^+$ и 0,5 мл 0,25 М раствора глюкозо-6-фосфата. Смесь тщательно перемешивают и помещают на 10 мин в термостат при 37°С. По окончании инкубации приливают последовательно по 1 мл растворов НСТ и ФМС. После перемешивания содержимого пробирку вновь помещают в термостат на 20—30 мин. Зоны локализации на колонке глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы окрашиваются в синий цвет. В грене обычно обнаруживают одну окрашенную зону.

В основе используемого в данной работе тетразолиевого метода для выявления дегидрогеназной активности лежит образование нерастворимых окрашенных веществ — формазанов. Являясь продуктами восстановления солей тетразолия, они возникают в зонах расположения на колонке дегидрогеназ. ФМС используют в качестве промежуточного переносчика водорода от восстановленных никотинамидных коферментов дегидрогеназ к солям тетразолия, с которыми НАД(Ф) Н непосредственно не реагирует. Образование нерастворимых формазанов при участии дегидрогеназ иллюстрирует следующая схема:



ОБНАРУЖЕНИЕ АСПАРТАТ-АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ (L-АСПАРТАТ: 2-ОКСОГЛУАТАРАТ-АМИНОТРАНСФЕРАЗА; КФ 2.6.1.1)

Оборудование, реактивы те же, что перечислены на страиице 134, за исключеиием реактивов для инкубациоиной смесн; а имеино: α-кетоглутаровая и L-аспарагииовая кнслоты в порошке; ЭДТА-фосфатный буфер (10 мг ЭДТА и 290 мг Na_2HPO_4 растворяют в 5 мл воды); прочный сииий ВВ (12 мг в 5 мл воды).

Получение белкового экстракта из грены и электрофорез белков проводят в соответствии с прописью, приведенной на странице 134.

Гелевую колонку, промытую дистиллированной водой, помещают на 20—30 мин в раствор, содержащий 7 мг α-кетоглутаровой кислоты и 13 мг L-аспарагиновой кислоты в 5 мл ЭДТА-фосфатного буфера. Затем раствор сливают, колонку ополаскивают дистиллированной водой и заливают 5 мл раствора прочного синего ВВ. Белковые фракции, обладающие аспартатаминотрасферазной активностью, окрашиваются в синий цеет и хорошо видны на светложелтом фоне колонки.

СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

Главное отличие ферментов от катализаторов небиологической природы состоит в исключительно высокой каталитической активности и ярко выраженной специфичности действия, что обусловлено особенностями строения и механизмом их действия.

СРАВНЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ НЕОРГАНИЧЕСКИХ КАТАЛИЗАТОРОВ И ФЕРМЕНТОВ

Оборудование, реактивы. Баня водяная; термометр лабораторный; штатив лабораторный с пробирками стеклянными химическими; пипетки с одной меткой на 1 мл (3 шт.); крахмал (1%-ный) в хлориде натрия (0,3%-ном); соляная кислота (10%-ная); иод (0,3%-ный) в иодиде калия (3%-ном); гидроксид натрия (10%-ный); сульфат меди (3%-ный).

В три пробирки наливают по 5 мл 1%-ного раствора крахмала. В первую пробирку добавляют 1 мл дистиллированной воды, во вторую — 1 мл 10%-ной соляной кислоты, а в третью — 1 мл слюны (приготовление см. с. 130). Пробирки 1 и 3 после перемешивания помещают в водяную баню при 38°С, а пробирку 2 — в кипящую водяную баню. Через 15—20 мин все пробирки вынимают из водяной бани, охлаждают и из каждой берут пробы для определения в них крахмала и глюкозы: первой — по реакции с иодом, второй — по реакции Троммера. Стеклянной палочкой наносят по капле раствора из каждой пробирки на фарфоровую пластинку рядом с ранее нанесенной каплей раствора иода в иодиде калия, после чего капли соединяют и перемешивают. По интенсивности окраски пробы делают заключение о степени гидролиза крахмала. Для определения глюкозы из каждой пробирки берут по 3 мл раствора, добавляют 1 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и несколько капель 1%-ного раствора сульфата меди. Верхний слой жидкости нагревают до кипения. Появление желтого осадка оксида меди (I) или красного металлической меди указывает на наличие глюкозы. Результаты опыта заносят в таблицу:

№ пробирки	Субстрат	Катализатор	После инкубации	
			проба с иодом	проба Троммера
1	Крахмал	—		
2	Крахмал	Соляная кислота		
3	Крахмал	Амилаза слюны		

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Специфичность действия — одно из важнейших свойств ферментов (см. учебник, с. 238). Основной причиной специфичности взаимодействия фермента и субстрата является комплементарность структуры активного центра фермента таковой субстрата.

Специфичность действия амилазы (α-1,4-глюкан — 4-глюканогидролаза; КФ 3. 2. 1. 1.) и сахаразы (β-D-фруктофуранозид — фруктогидролаза; КФ 3. 2. 1. 26)

Оборудованне, реактнвы. Термометр лабораторный; баня водяная; пнпеткн с одной меткой на 2 мл (4 шт.); раствор слюны разбавленной (прнготовленне см. с. 130); препарат дрожжевой сахаразы (1%-ный, прнготовленне см. с. 122); тростннковый сахар (2%-ный); сульфат медн (1%-ный); гндрокснд натрия (10%-ный); нод (0,3%-ный) в ноднде калня (3%-ном); фелингова жндкость (см. прнложенне).

Нумеруют четыре пробирки. В пробирки 1 и 2 наливают по 2 мл раствора крахмала; в пробирки 3 и 4 — по 2 мл раствора сахарозы. Затем в пробирки 1 и 3 вносят по 0,5 мл раствора слюны, а в пробирки 2 и 4 — по 0,5 мл 1%-ного раствора препарата дрожжевой сахаразы. Перемешивают содержимое и ставят на 10 мин в водяную баню, нагретую до 38—40°С. После охлаждения проделывают реакции (см. предыдущую работу) с иодом на присутствие крахмала в пробах 1 и 2 и глюкозы — в пробах 3 и 4. Делают заключение о специфичности изученных ферментов.

Специфичность действия сукцинатдегидрогеназы (сукцинат: акцептор — оксидоредуктаза; КФ 1. 3. 99. 1)

Оборудованне, реактнвы. Термометр лвбораторный; баня водяная; пнпеткн градунрованные на 1 мл (3 шт.); кашнцв мышечная (прнготовленне см. с. 124); янтарная кнслота (3%-ная, нейтрвлнзованная); яблочная кнслота (3%-ная, нейтралнзованная); метнленовый снннй (0,02%-ная).

В три пронумерованные пробирки помещают 3—4 мл мышечной кашицы и добавляют: в первую — 0,5 мл 3%-ного раствора янтарной кислоты, во вторую — 0,5 мл 3%-ного раствора яблочной кислоты и в третью — 0,5 мл воды. В каждую пробирку вносят по 2—3 капли 0,02%-ного раствора метиленового синего (до окрашивания смеси в голубой цвет). Содержимое пробирок перемешивают и одновременно помещают их в водяную баню при температуре 37—40°С. Через 5—10 мин наблюдается обесцвечивание метиленового синего в первой пробирке и отсутствие обесцвечивания в двух других. Первую пробирку сильно взбалтывают, вновь появляется синее окрашивание вследствие окисления лейкооснования метиленовой сини кислородом воздуха.

Сукцинатдегидрогеназа (флавопротеид) окисляет янтарную кислоту в фумаровую. В роли промежуточного акцептора водорода в данном опыте выступает метиленовая синь (с. 132), которая далее

(при встряхивании) отдает принятый водород кислороду воздуха. Ход процесса показан на схеме:

$HOOC-CH_2-CH_2-COOH$ — *Янтарная кислота* → $HOOC(H)C=C(H)COOH$ — *Фумаровая кислота*

ФАД → $ФАД \cdot H_2$

Метиленовая синь (восстановленная форма; бесцветна) ⇄ *Метиленовая синь (окисленная форма; окрашена)*

O_2 → H_2O_2

Групповая специфичность действия сахаразы (β-D-фруктофуранозид — фруктогидролаза; КФ 3. 2. 1. 26)

Оборудование, реактивы. Баня водяная; термометр лабораторный; пипетки градуированные на 2 мл (3 шт.), 5 мл (2 шт.); мука соевая (1%-ная); дрожжевая сахараза (приготовление см. с. 122); сахароза (1%-ная); раффиноза (1%-ная); фелингова жидкость (см. приложение).

В одну пробирку наливают 2 мл 1%-ного раствора сахарозы, а в другую — 2 мл 1%-ного раствора раффинозы. Добавляют в обе пробирки по 1 мл 1%-ного раствора препарата дрожжевой сахаразы и, перемешав содержимое каждой пробирки, ставят их на 5—10 мин в водяную баню при 35—40°С. Затем исследуют содержимое обеих пробирок на присутствие восстанавливающих углеводов. Для этого в обе пробирки наливают по 3 мл фелинговой жидкости, хорошо перемешивают и смесь нагревают до кипения. В обеих пробирках проба с фелинговой жидкостью положительна, так как β-гликозидная связь гидролизуется в присутствии сахаразы в молекулах как сахарозы, так и раффинозы. Уравнение реакции гидролиза сахарозы приведено в учебнике (см. с. 246), а раффинозы — дано ниже:

Раффиноза + H_2O —*Сахараза*→

Раффиноза
(*α, D-галактопиранозидо-1,6′-α, D-глюкопиранозидо-1′, 2″-β, D-фруктофуранозид*)

→ *Фруктоза* + *Мелибиоза*

Фруктоза

Мелибиоза
(*α, D-галактопиранозидо-1,6′-α, D-глюкопираноза*)

Абсолютная специфичность действия уреазы (карбамидамидогидролаза; КФ 3. 5. 1. 5)

Оборудование, реактивы. Пипетки с одной меткой на 5 мл (2 шт.); соевая мука (см. с. 123); красная лакмусовая бумажка, мочевина (5%-ная); ацетамид (5%-ный).

В одну пробирку наливают 5%-ный раствор мочевины, в другую — 5%-ный раствор ацетамида. Добавляют при помешивании в каждую пробирку около 1 г соевой муки. В отверстие каждой из пробирок помещают полоску влажной красной лакмусовой бумажки. Через несколько минут лакмусовая бумажка в пробирке с мочевиной синеет от выделяющегося аммиака, который можно обнаружить и по запаху. В пробирке с ацетамидом изменения окраски лакмусовой бумажки не наблюдается, что доказывает абсолютную специфичность действия уреазы. Уравнение реакции гидролиза мочевины в присутствии уреазы приведено на странице 123.

ТЕРМОЛАБИЛЬНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Зависимость между возрастанием скорости ферментативных реакций и денатурацией белков-ферментов при повышении температуры носит довольно сложный характер и рассмотрена в учебнике (с. 236). Температура, соответствующая максимальной скорости ферментативной реакции, называется оптимальной (Топт). Для большинства ферментов, выделенных из теплокровных животных, она равна 37—40°С. Как правило, ферментативные процессы не могут протекать при температуре выше 70°С. При переходе к субоптимальным температурам скорость ферментативного катализа падает, достигая при 0°С минимальной величины.

Влияние температуры на активность амилазы слюны

Оборудование, реактивы. Баня водяная; термометр лабораторный; пипетки на 1 мл, 2 мл; палочки стеклянные; пластинка фарфоровая; слюна разбавленная (приготовление см. с. 130); крахмал (1%-ный); иод (0,3%-ный) в иодиде калия (3%-ном); гидроксид натрия (10%-ный); сульфат меди (1%-ный).

В четыре пронумерованные пробирки наливают по 2 мл 1%-ного раствора крахмала. Пробирку *1* помещают в кипящую водяную баню, пробирку *2* — в водяную баню при 40°С, пробирку *3* оставляют при комнатной температуре и пробирку *4* помещают в лед. Через 10 мин, когда содержимое пробирок примет заданную температуру, во все пробирки добавляют по 0,5 мл разбавленной в 10 раз слюны, перемешивают с помощью стеклянной палочки и оставляют в тех же условиях. Наблюдение за ходом гидролиза крахмала ведут по реакции с иодом. Для этого наносят на фарфоровую пластинку несколько капель раствора иода в иодиде калия и смешивают их с каплями гидролизуемой смеси из каждой пробирки, беря пробы через 1, 2, 4, 6, 8, 10 и 12 мин. По изменению

окраски крахмала с иодом судят о степени гидролиза крахмала в каждой пробирке. Результаты наблюдений заносят в таблицу, помечая буквой «с» (синяя окраска) положительную пробу с иодом на крахмал, буквой «к» — положительную пробу на декстрины (окраска красных тонов) и буквой «ж» — отрицательную пробу (желтая окраска иода).

Номер пробирок	Температура в пробирке (в °С)	Реакция с иодом по истечении времени (в мин)						
		1	2	4	6	8	10	12
1	100							
2	40							
3	15—20							
4	0							

На основании полученных данных делают вывод о величине температурного оптимума для амилазы слюны.

Влияние температуры на активность пепсина

Оборудование, реактивы. Баня водяная, пипетки с одной меткой на 2 мл, 0,1 мл (1 шт.); смесь молочноацетатная, состоящая из равных объемов свежего молока и ацетатного буфера (с. 129); желудочный сок профильтрованный (готовый препарат).

В четыре пробирки наливают по 2 мл молочноацетатной смеси. Пробирку *1* помещают в кипящую водяную баню; пробирку *2* — в водяную баню при 40°С; пробирку *3* оставляют при комнатной температуре; пробирку *4* помещают в лед. Через 10 мин, когда содержимое пробирок примет необходимую температуру, во все пробирки добавляют по 0,1 мл желудочного сока, быстро перемешивают и оставляют в тех же условиях. Наблюдая за моментом появления на стенках пробирок первых сгустков казеина, образующегося из казеиногена под действием пепсина, отмечают оптимальную температуру действия данного фермента.

Термическая инактивация кислой фосфатазы грены тутового шелкопряда

Оборудование, реактивы. Приборы и реактивы для выполнения электрофореза в полиакриламидном геле (с. 51); баня водяная; белковый экстракт из зимующей грены тутового шелкопряда (приготовление см. с. 134); буфер ацетатный (0,2 М; pH 4,8); прочный синий В (12 мг в 1 мл воды); инкубационная смесь для выявления кислой фосфатазы (с. 135).

После проведения фракционирования белков экстракта грены методом электрофореза в полиакриламидном геле в соответствии с прописью, приведенной на странице 134 гелевые колонки, извлеченные из стеклянных трубочек и промытые дистиллированной водой, помещают в пробирки с дистиллированной водой. Одну из пробирок оставляют при комнатной температуре, другую помещают в водяную баню, нагретую до температуры 60°С,

на 5 мин. Через указанный промежуток времени обе колонки переносят в инкубационную смесь для выявления кислой фосфатазы (с. 135). На колонке, подвергнутой нагреванию, кислая фосфатаза не выявляется; на другой же (контрольной) отчетливо выявляются несколько ее форм.

ВЛИЯНИЕ pH СРЕДЫ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Оборудование, реактивы. Баня водяная; термометр лабораторный; пластинка фарфоровая; бюретки прямые с краном на 50 мл (2 шт.); пипетки с одной меткой на 1 мл (2 шт.); палочки стеклянные (4 шт.); слюна разбавленная (с. 130); дигидрофосфат калия ($^1/_{15}$ М) и гидрофосфат натрия ($^1/_{15}$ М); крахмал (0,5%-ный); иод (0,3%-ный) в иодиде калия (3%-ном).

Серии растворов с определенными значениями pH получают, используя фосфатный буфер. Две бюретки заполняют $^1/_{15}$ М раствором дигидрофосфата натрия и $^1/_{15}$ М раствором гидрофосфата калия. Растворы смешивают в определенных соотношениях таким образом, что в каждой пробирке получают по 5 мл буферной смеси с величинами pH: 5,59; 6,98; 7,38; 8,04 (см. приложение, с. 302). В каждую из четырех пробирок добавляют по 1 мл 0,5%-ного раствора крахмала, 1 мл разбавленной в 10 раз слюны и тщательно перемешивают содержимое с помощью стеклянной палочки. Далее все пробирки, не вынимая из них стеклянных палочек, помещают в водяную баню, нагретую до 40°C. Спустя 3—5 мин из всех пробирок палочками наносят на фарфоровую пластинку по капле смеси, рядом с предварительно уже нанесенными на нее каплями раствора иода. Капли соединяют и, если наблюдается различие в окраске с иодом в испытуемых пробах, пробирки вынимают из бани, охлаждают и добавляют в каждую по 3—4 капли раствора иода в иодиде калия. При отсутствии заметного различия в окраске проб с иодом на фарфоровой пластинке продолжают нагревание пробирок в водяной бане еще несколько минут. Затем вновь испытывают на пластинке пробы на степень расщепления крахмала. Эту операцию повторяют до тех пор, пока не произойдет заметных сдвигов в окраске проб с иодом. Продолжают инкубацию всех проб в присутствии добавленного иода и для каждой из них отмечают время, когда исчезнет синее окрашивание (окончание амилолитического расщепления). Полученные результаты выражают графически: по оси абсцисс наносят значение pH опытов, а по оси ординат—время расщепления крахмала при соответствующих значениях pH. Соединяя точки линией, получают кривую, характеризующую зависимость активности фермента от значения pH среды.

Определение оптимального значения pH для амилазы слюны

Оборудование, реактивы. Фотоэлектроколориметр; термостат; пипетки на 1 мл (2 шт.); бюретки прямые с краном на 50 мл (5 шт.); колбы конические на 100 и 250 мл; воронка; иод (0,3%-ный) в иодиде калия (3%-ном); крахмал (0,1%-ный); дигидрофосфат калия ($^1/_{15}$ М) и гидрофосфат натрия ($^1/_{15}$ М); слюна, разбавленная в 40 раз (с. 130).

Пробирки устанавливают в два ряда: по 5 шт. в каждом ряду. В пробирки первого ряда вносят по 0,2 мл разбавленного раствора слюны, в пробирки второго ряда — по 0,2 мл дистиллированной воды. Затем в каждую пробирку приливают из бюретки по 4 мл фосфатного буферного раствора таким образом, чтобы первые пробирки обоих рядов содержали буферный раствор с pH 5,59; вторые пробирки с pH 6,24; третьи с pH 6,98; четвертые с pH 7,38; пятые с pH 8,04. Пробирки закрывают пробками и помещают в термостат при температуре 37°С на 10 мин, после чего во все пробирки вносят по 0,2 мл раствора крахмала, нагретого до 37°С. Содержимое пробирок перемешивают и пробы инкубируют в термостате в течение 10—15 мин при 37°С. Далее пробирки помещают в лед и в каждую пробирку прибавляют по 3—4 капли раствора иода, перемешивают содержимое и колориметрируют со светофильтром № 7. Активность амилазы рассчитывают по разнице экстинкций между контрольной и опытной пробами (с раствором слюны). $E_ф = E_к - E_{оп}$, где $E_ф$ — экстинкция, соответствующая активности амилазы в исследуемом растворе, $E_к$ — экстинкция контрольной пробы; $E_{оп}$ — экстинкция опытной пробы. На основании полученных данных строят график зависимости активности амилазы от величины pH и находят на нем оптимальное значение pH фермента, для чего на оси ординат откладывают значения $E_ф$, на оси абсцисс — значение pH.

ДЕЙСТВИЕ АКТИВАТОРОВ И ИНГИБИТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Помимо температуры и pH, большое влияние на активность ферментов оказывает присутствие в растворе некоторых химических соединений. Одни из них повышают активность ферментов (активаторы), другие понижают (ингибиторы). К активаторам относят многие ионы Na^+, Mg^{+2}, Mn^{+2}, Co^{+2} и др. Из ингибиторов ферментов известны соли синильной кислоты, угнетающие некоторые геминовые ферменты, монойодуксусная кислота, приостанавливающая спиртовое и молочнокислое брожение, фосфорорганические соединения, необратимо инактивирующие ряд эстераз, и др.

Действие активаторов и ингибиторов на амилазу слюны

Оборудование, реактивы. Термостат на 40°С; бюретки прямые с краном на 50 мл (2 шт.); пипетки с одной меткой на 1 мл (4 шт.); 2 штатива лабораторных с пробирками; слюна неразбавленная профильтрованная; крахмал (0,5%-ный); хлорид натрия (1%-ный); сульфат меди (1%-ный); иод (0,3%-ный) в иодиде калия (3%-ном).

В штативах располагают тремя рядами 36 пробирок и нумеруют их в каждом ряду. Во все пробирки вливают из бюретки по 1 мл воды, а затем в первые пробирки каждого ряда — по 1 мл профильтрованной неразбавленной слюны. Содержимое пробирок хорошо перемешивают. Далее в каждом ряду 1 мл смеси из пробирки 1 переносят в пробирку 2, перемешивают, снова набирают 1 мл смеси и переносят в пробирку 3 и т. д. вплоть до пробирки 12, из которой после перемешивания выливают 1 мл жидкости.

Во все пробирки первого ряда наливают по 1 мл воды (контрольный ряд); в пробирки второго ряда — по 1 мл раствора хлорида натрия и в пробирки третьего ряда — по 1 мл раствора сульфата меди. Далее во все пробирки приливают из бюретки по 2 мл раствора крахмала в следующем порядке: сначала в первые номера всех рядов, затем во вторые и т. д. Содержимое пробирок перемешивают и ставят штативы с пробирками в термостат при 40°С на 15 мин. По охлаждении в каждую из них добавляют по капле раствора иода в иодиде калия и отмечают в каждом ряду номер пробирки, в которой реакция на крахмал отрицательна. Деля степень разведения контрольной пробы, в которой реакция с иодом отрицательна, на степень разведения соответствующих проб с исследуемыми эффекторами, вычисляют, во сколько раз активатор (NaCl) или ингибитор ($CuSO_4$) стимулирует или тормозит действие амилазы слюны.

Ингибирующее действие фенилтиомочевины на фенолоксидазу (*о*-дифенол: O_2 — оксидоредуктаза; КФ 1. 10. 3. 1) картофеля

Оборудование, реактивы. Сырой картофель; гваяковая смола (5%-ный спиртовой раствор); фенилтиомочевина (порошок).

Клубень картофеля разрезают пополам. На обе половинки наносят 1—2 капли 5%-ного спиртового раствора гваяковой смолы и одну из них немедленно посыпают порошком фенилтиомочевины. На контрольной половине клубня картофеля появляется яркое синее окрашивание, обусловленное образованием окрашенных продуктов окисления гваяковой смолы. На другой половине окрашивания не происходит вследствие инактивации фермента фенилтиомочевиной.

Конкурентное торможение сукцинатдегидрогеназной (сукцинат: акцептор — оксидоредуктаза; КФ 1. 3. 99. 1) активности

Оборудование, реактивы. Баня водяная; пипетки градуированные на 1 мл (5 шт.); кашица мышечная (с. 124); масло вазелиновое; малоновая кислота (1%-ная нейтрализованная); янтарная кислота (1%-ная нейтрализованная); метиленовый синий (1%-ный).

В три пронумерованные пробирки помещают по 3—4 г мышечной кашицы и добавляют: в первую — 0,4 мл воды, во вторую — 0,2 мл 1%-ного раствора малоновой кислоты и 0,2 мл воды и в третью — 0,4 мл 1%-ного раствора малоновой кислоты. Во все три пробирки добавляют по 1 мл 1%-ного раствора янтарной кислоты, по 2—3 капли 1%-ного раствора метиленового синего и после перемешивания по 3—4 капли вазелинового масла. Пробирки ставят в водяную баню, нагретую до 40°С. Через 3—5 мин наблюдается почти полное исчезновение голубой окраски в пробирке *1*, некоторое уменьшение интенсивности окраски в пробирке 2 и полное сохранение ее в пробирке 3. Сукцинатдегидрогеназная активность тормозится в присутствии малоновой кислоты вследствие близости ее структуры к таковой янтарной кислоты и происходящей вследствие этого конкуренции за фермент.

Ингибирующее действие хлорид-ионов на дегидрогеназный комплекс картофеля

Оборудование, реактивы. Сырой картофель; хлорид натрия; иодид натрия; хлорат калия $KClO_3$.

Две картофелины разрезают пополам. Первую половину оставляют для контроля, вторую — посыпают хлоридом натрия, третью иодидом натрия, четвертую — хлоратом калия. Через 15—20 мин срезы трех половинок темнеют, а срез с хлоридом натрия остается без изменения.

Ингибирующее действие ионов меди на арилэстеразу (гидролаза арилэфиров; КФ 3. 1. 1. 2) грены тутового шелкопряда

Оборудование, реактивы. Приборы и реактивы для фракционирования белков методом электрофореза в полиакриламидном геле (с. 51); термостат на 40° С; пипетки градуированные на 1 мл (3 шт.), 10 мл (2 шт.); экстракт из грены тутового шелкопряда (с. 134); α-нафтилацетат (1%-ный) в ацетоне (50%-ном); *трис*-HCl буфер (0,2 М; pH 7,1); прочный синий В (2 мг в 1 мл воды); сульфат меди (1%-ный).

После проведения электрофоретического фракционирования белков грены тутового шелкопряда в соответствии с прописью на (с. 134) две гелевые колонки ополаскивают дистиллированной водой и помещают в пробирки, в которые наливают по 9 мл 0,2 М *трис*-HCl буферного раствора (pH 7,1) и 0,5 мл 1%-ного раствора α-нафтилацетата. Затем в одну из них приливают 1 мл 1%-ного раствора сульфата меди. Пробирки с помещенными в них гелевыми колонками выдерживают 10 мин в термостате при 37°С, после чего в каждую из них приливают по 1 мл раствора прочного синего В. Через 10 мин в контрольной гелевой колонке отчетливо обозначаются окрашенные в коричневый цвет зоны локализации эстеразной активности. Напротив, на гелевой колонке, помещенной в среду с ингибитором ($CuSO_4$), никаких следов окраски не обнаруживается.

Активирующее действие ионов Mn^{+2} и Mg^{+2} на малатдегидрогеназу (L-малат: НАД — оксидоредуктаза; КФ 1. 1. 1. 37) грены тутового шелкопряда

Оборудование, реактивы. Приборы и реактивы для фракционирования белков методом электрофореза в полиакриламидном геле (с. 51); термостат на 40° С; пипетки с одной меткой на 1 мл (5 шт.), 10 мл (1 шт.); экстракт из грены тутового шелкопряда (получение см. с. 134); малат натрия (1%-ный); НАД (4 мг); НСТ (4 мг); хлорид марганца (1%-ный); хлорид магния (1%-ный); фосфатный буферный раствор (0,2 М; pH 7,4); раствор ФМС (0,2 мг в 1 мл воды).

Фракционируют белки грены тутового шелкопряда методом электрофореза в полиакриламидном геле по прописи, приведенной на странице 55. Готовят 18 мл инкубационной смеси, смешивая 16 мл фосфатного буфера и 2 мл 1%-ного раствора малата натрия и растворяя в ней 4 мг НАД и 4 мг НСТ. Инкубационную смесь разливают в две пробирки поровну, в одну из них добавляют 1 мл 1%-ного раствора хлорида марганца (или хлорида магния), а в другую — 1 мл воды. Обе пробирки выдерживают 10 мин в термостате при 37°С, после чего в них добавляют по 1 мл раствора ФМС. Отмечают время появления окраски в зонах локализации малатдегидрогеназы на обеих гелевых колонках и убеждаются в том, что оно намного меньше в пробе с ионами Mn^{+2} (или Mg^{+2}) по сравнению с контролем.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

Большинство существующих методов количественного определения ферментов основано на определении их активности в условиях, оптимальных для их действия. Поскольку в ряде случаев количество и масса фермента не могут быть измерены в абсолютных величинах (миллиграммах или молях), его выражают в условных единицах. Способы выражения концентрации ферментов даны в учебнике (с. 235). Если субстратом действия фермента служат белок, полисахарид или иное вещество, в котором фермент атакует более одной связи, то ферментную единицу выражают не в микромолях субстрата, превращенного им за 1 мин, а в микроэквивалентах затронутых реакцией групп в 1 мин.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВ ГЕМОЛИФМЫ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

Метод основан на том, что в процессе инкубации происходит реакция сочетания между β-нафтолом, освобождающимся при гидролизе субстрата эстеразой, и солью диазония (прочный синий В). В результате образуется окрашенное в малиновый цвет азосоединение.

Оборудование, реактивы. Спектрофотометр СФ-16; пипетки на 1,2 и 5 мл; пробирки; 0,1%-ный раствор β-нафтилацетата в 0,05М-фосфатном буфере (pH 7,2); 0,25%-ный водный раствор гемолимфы (готовят из лиофилизированной ткани); водный раствор прочного синего В и додецилсульфата натрия — SDS (в 7 мл дистиллированной воды растворяют 20 мг прочного синего В и 250 мг SDS).

В пробирку вносят 0,2 мл раствора β-нафтилацетата, 0,4 мл водного раствора гемолимфы и 0,4 мл дистиллированной воды. Смесь перемешивают и ставят в инкубационный шкаф при 37°С на 20 мин. По истечении указанного времени реакцию останавливают добавлением 1 мл смеси из прочного синего В и додецилсульфата натрия. Содержимое пробирки перемешивают. Из окрашенного в малиновый цвет раствора отбирают пробы по 0,5 мл. Прибавляют к каждой пробе 3 мл воды, вновь перемешивают и спектрофотометрируют на СФ-16 при 550 нм против контроля, включающего все компоненты, кроме гемолимфы. Активность эстераз выражают в миллиграммах β-нафтилацетата, расщепляемых за 1 мин, условно принимая, что единица экстинкции ($1E$) соответствует 1 мг β-нафтилацетата. Удельную активность выражают в единицах на 1 мг белка.

$$\text{Уд. активность} = \frac{E \cdot a \cdot b}{c \cdot d \cdot t},$$

где a — количество инкубационной смеси; b — количество раствора для спектрофотометрирования; c — аликвота из инкубационной смеси (0,5 мл); d — количество белка в 1 мл гемолимфы; t — время инкубации (мин).

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ (ФОСФОГИДРОЛАЗА МОНОЭФИРОВ ОРТОФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ; КФ 3.1.3.2) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Метод основан на способности фермента ускорять реакцию гидролиза сложноэфирной связи *п*-нитрофенилфосфата. Освобождающийся при гидролизе *п*-нитрофенол в щелочной среде дает желтое окрашивание. Степень интенсивности окраски раствора характеризует активность фермента:

$$O_2N-C_6H_4-O-P(OH)_2{=}O + H_2O \xrightarrow{\text{Кислая фосфатаза}} O_2N-C_6H_4-OH + H_3PO_4,$$

$$O_2N-C_6H_4-OH + NaOH \longrightarrow NaO(O)N{=}C_6H_4{=}O + H_2O$$

Оборудование, реактивы. Фотоэлектроколориметр; колба мерная на 100 мл; пипетки с одной меткой на 0,1, 2 и 5 мл; сыворотка крови (с. 48); субстратно-буферный раствор (pH 4,8, 410 мг лимонной кислоты, 1,125 г цитрата

натрия и 165 мг *п*-нитрофенилфосфата натрия растворяют в 100 мл бидистиллированной воды; реактив устойчив при 0°С в течение недели); стандартный раствор *п*-нитрофенола (растворяют 13,9 мг *п*-нитрофенола в 100 мл 0,02 н. раствора гидроксида натрия); гидроксид натрия (0,1 н. и 0,02 н.).

В две пробирки вносят по 5 мл субстратно-буферного раствора, доведенного до температуры 37°С. Затем в одну из пробирок (опыт) добавляют 0,1 мл сыворотки крови, а в другую (контроль) — 1 мл воды. Смеси тщательно перемешивают и инкубируют в течение 30 мин при 37°С, после чего в обе пробирки прибавляют по 5 мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия. Перемешивают и фотометрируют при 420 нм в кювете толщиной 1 см против 0,02 н. раствора гидроксида натрия.

За единицу активности принимают такое количество фермента, которое освобождает 1 мкмоль *п*-нитрофенола в заданных условиях (0,1 мл сыворотки крови, конечный объем испытуемого раствора 11,1 мл, время инкубации 30 мин, оптимальная температура 37°С). При расчете активности пользуются калибровочной кривой, которую строят следующим образом: 1, 2, 3, 5 и 7 мл стандартного раствора *п*-нитрофенола, содержащих соответственно 1, 2, 3, 4 и 5 мкмоль вещества, доводят до конечного объема 11,1 мл с помощью 0,02 н. раствора гидроксида натрия и измеряют величину экстинкции окрашенных растворов против 0,02 н. раствора гидроксида натрия при 420 нм. По оси ординат откладывают значения экстинкций, а по оси абсцисс — количество *п*-нитрофенола. По калибровочной кривой находят количество *п*-нитрофенола в пробе и рассчитывают активность фермента.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЛАНИН- И АСПАРТАТ — АМИНОТРАНСФЕРАЗ (L-АЛАНИН: 2-ОКСОГЛУТАРАТ — АМИНОТРАНСФЕРАЗА; КФ 2.6.1.2.; L-АСПАРТАТ: 2-ОКСОГЛУТАРАТ — АМИНОТРАНСФЕРАЗА; КФ 2.6.1.1) КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ (ПО ПАСХИНОЙ Т. С.)

Метод основан на определении 2,4-динитрофенилгидразона пировиноградной кислоты (ПВК), образующегося при взаимодействии 2,4-динитрофенилгидразина с ПВК, образующейся в процессе переаминирования при участии аланин — аминотрансферазы (АлАТ). Щавелевоуксусная кислота, образующаяся при действии аспартат-аминотрансферазы (АсАТ), с помощью анилинцитрата декарбоксилируется и превращается также в ПВК, 2,4-динитрофенилгидразон которой также определяют колориметрическим путем. Пробу экстрагируют толуолом, в который переходит только 2,4-динитрофенилгидразон ПВК, а соответствующее производное α-кетоглутаровой кислоты остается в водном растворе. При добавлении к этому экстракту спиртового раствора щелочи развивается стабильное красное окрашивание. Интенсивность окрашивания (оптическая плотность при 470 нм) пробы пропорциональна

концентрации ПВК, содержание которой рассчитывают по калибровочному графику, построенному по стандартным растворам ПВК.

Оборудование, реактивы. Центрифуга; баня водяная; фотоэлектроколориметр; набор пипеток градуированных на 1, 2, 5 и 10 мл; сыворотка крови (приготовление см. с. 49); раствор 1 (1,33 г DL-аспарагиновой кислоты, 0,073 г α-кетоглутаровой кислоты, 0,4 г безводного Na_2HPO_4 и 0,07 г KH_2PO_4 отвешивают в мерную колбу на 50 мл, добавляют 4,4 мл 10%-ного раствора NaOH и объем раствора доводят до метки дистиллированной водой, после чего добавляют 0,2 мл хлороформа, тщательно перемешивают. Раствор хранят в замороженном состоянии); раствор 2 (в мерную колбу на 50 мл отвешивают 0,89 г DL-аланина, 0,073 г α-кетоглутаровой кислоты, 0,4 г Na_2HPO_4 и 0,07 г KH_2PO_4, приливают 5—8 мл воды и 0,4 мл 10%-ного раствора NaOH. Смесь тщательно перемешивают, после чего доводят до метки дистиллированной водой. К полученному раствору добавляют 0,2 мл хлороформа, перемешивают и хранят в замороженном состоянии); гидроксид натрия (10%-ный); 2,4-динитрофенилгидразин (0,1%-ный; 0,2 г 2,4-динитрофенилгидразина отвешивают в мерную колбу на 200 мл, добавляют 40 мл концентрированной HCl, нагревают на кипящей водяной бане 1—2 мин до растворения реактива. По охлаждении доводят объем до метки дистиллированной водой); анилинцитрат (5 г лимонной кислоты растворяют в 5 мл воды и смешивают с 5 мл анилина, хорошо перемешивают; хранят в темной склянке); гидроксид калия (2.5%-ный спиртовой раствор); толуол водонасыщенный (к 250 мл толуола добавляют 15—20 мл воды, встряхивают 20 мин, переливают в делительную воронку, дают расслоиться и отделяют слой толуола); пируват натрия (стандартный раствор 0,005%-ный); хлороформ; феноловый красный (0,04%-ный).

Определение активности (аспартат аминотрансферазы (АсАТ)

В центрифужные пробирки вносят: в одну — 0,5 мл раствора 1 (опыт) (в этом объеме раствора содержится 50 мкмоль L-аспарагиновой кислоты и 5 мкмоль α-кетоглутаровой кислоты), а в другую — 0,5 мл воды (контроль). Пробирки помещают на 4—5 мин в водяную баню, нагретую до 25°С. Затем в пробирки вносят по 0,5 мл сыворотки крови, перемешивают и вновь выдерживают при 25°С в течение 20 мин. После этого добавляют по 3 капли раствора анилинцитрата, хорошо перемешивают и оставляют еще на 20 мин в тех же условиях. Далее в пробирки добавляют по 0,5 мл 0,1%-ного раствора 2,4-динитрофенилгидразина, перемешивают и оставляют на 5 мин при комнатной температуре, после чего приливают по 2,5 мл водонасыщенного толуола. Содержимое пробирок энергично встряхивают и полученную эмульсию центрифугируют при 2000 g в течение 5 мин. Затем отбирают по 1,5 мл толуолового экстракта (верхний слой) в сухие пробирки и добавляют в каждую по 4,5 мл 2,5%-ного спиртового раствора щелочи. После перемешивания содержимое пробирок выдерживают в течение 10 мин при комнатной температуре для развития окраски, интенсивность которой измеряют на фотоэлектроколориметре с синим фильтром при 470 нм в кюветах толщиной 1 см против контрольной пробы.

Определение активности аланинаминотрансферазы (АлАТ)

В центрифужные пробирки вносят: в одну — 0,5 мл раствора 2 (опыт), а в другую — 0,5 мл воды (контроль) и помещают их в водяную баню при 25°С на 5 мин, после чего добавляют в каждую по 0,5 мл сыворотки крови. Смесь инкубируют в течение 10 мин при 25°С, а затем приливают по 0,5 мл 0,1%-ного раствора 2,4-динитрофенилгидразина, тщательно перемешивают и оставляют на 5 мин в тех же условиях. Дальнейший анализ ведут тем же путем, что и при определении активности АсАТ.

Найденные количества АсАТ и АлАТ выражают в условных единицах. За единицу фермента принимают такое его количество, которое образует в указанных выше условиях 1 мкг ПВК. В стандартных условиях 1 мкг ПВК соответствует (при 470 нм) оптической плотности 0,015. Для того чтобы перейти от оптической плотности в опыте к числу единиц фермента в 1 мл сыворотки, величину оптической плотности, полученную в опыте, делят на 0,015 и умножают на 2 (т. е. делят на 0,0075). В расчетах удобнее пользоваться обратной величиной (1 : 0,0075 = 133). Если, например, величина оптической плотности в опыте равна 0,258, то содержание фермента в сыворотке крови в условных единицах составляет (0,258 · 133) 34,4 *Е*/мл.

Разумеется, что активность аминотрансфераз может быть найдена и по калибровочному графику. Для этого в четыре пробирки наливают 0,2; 0,4; 0,6 и 0,8 мл 0,005%-ного стандартного раствора ПВК, что соответствует 8,16, 24 и 32 мкг ПВК в пробе. В каждую пробирку добавляют воду до 1 мл, затем — по 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина, перемешивают и через 5 мин приливают 2,5 мл водонасыщенного толуола. Содержимое пробирок встряхивают 0,5 мин, после чего центрифугируют. Из верхнего толуолового слоя отбирают по 1,5 мл центрифугата в сухие пробирки и добавляют по 4,5 мл спиртового раствора щелочи. Через 10 мин пробы фотометрируют при 470 нм в кюветах толщиной 1 см против контроля (в контрольную пробу вместо ПВК добавляют 1 мл воды). По оси ординат откладывают найденные величины оптической плотности, а по оси абсцисс — содержание ПВК (в мкг).

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИЛАЗЫ (ПО ВОЛЬГЕМУТУ)

Метод основан на выявлении предельного разбавления раствора амилазы, при котором еще происходит в стандартных условиях расщепление определенного количества крахмала до эритродекстрина.

Оборудование, реактнвы. Термостат иа 40°С; штатив лабораторный с пробирками; пнпеткн на 1 мл (4 шт.), 2 мл и 5 мл; препарат грибных амнлаз (получеиие см. с. 125); крахмал (1%-ный) в хлорнде иатрия (1%-иом); сериая кислота (10%-иая); иод (0,3%-ный) в иоднде калия (3%-иом).

0,2 г препарата грибных амилаз смешивают с 5 мл воды, нагретой до 37°С, встряхивают 5 мин и инкубируют в термостате 2 ч при 37°С, изредка встряхивая. Осадок отфильтровывают и отбрасывают, а вытяжку грибных амилаз используют в работе. Нумеруют 12 пробирок и вносят в каждую из них по 1 мл воды. Далее в пробирку *1* добавляют 1 мл вытяжки грибных амилаз и хорошо перемешивают. Затем 1 мл жидкости из пробирки *1* переносят в пробирку *2*. Жидкость в пробирке *2* также тщательно перемешивают и 1 мл жидкости из нее переносят в пробирку *3* и т. д. Из последней (12-й) пробирки 1 мл смеси выливают. В каждую пробирку вносят по 2 мл 1%-ного раствора крахмала. Все пробирки помещают в термостат при 37°С на 30 мин, а затем в них прибавляют по 1 мл 10%-ной серной кислоты (для прекращения действия фермента) и по 1—2 капли раствора иода в иодиде калия. Результаты наблюдений заносят в таблицу, обозначая синюю, красную и желтую окраску буквами «с», «к» и «ж».

	Разведение вытяжки в пробирках (1—12)											
	$^1/_2$ (1)	$^1/_4$ (2)	$^1/_8$ (8)	$^1/_{16}$ (4)	$^1/_{32}$ (5)	$^1/_{64}$ (6)	$^1/_{128}$ (7)	$^1/_{256}$ (8)	$^1/_{512}$ (9)	$^1/_{1024}$ (10)	$^1/_{2048}$ (11)	$^1/_{4096}$ (12)
Окраска раствора												

Отмечают, при каком разведении произошел полный гидролиз крахмала, т. е. находят пробирку с желтой окраской, за которой следует пробирка с красно-фиолетовой окраской (неполный гидролиз).

Допустим, что найденная граница лежит между пробирками 7 и 8 (т. е. в пробирке 7 раствор окрашен в желтый цвет). Умножив величину разбавления (в данном случае 128) на 2 (число миллилитров раствора крахмала в опыте), получим амилазное число для данного раствора: 128 · 2 = 256, т. е. под влиянием грибных амилаз, содержащихся в 1 мл неразбавленной вытяжки, произошло расщепление 256 мл 1%-ного раствора крахмала.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАТАЛАЗЫ (ПО А. Н. БАХУ И А. И. ОПАРИНУ)

Оборудованне, реактнвы. Бюреткн прямые с краиом иа 50 мл (2 шт.); пнпеткн с одной меткой иа 5, 20 н 25 мл; цнлнндры нзмернтельные с иосиком на 10 и 25 мл; колба мерная на 100 мл; колбы коннческне на 200 мл (2 шт.); ступка фарфоровая с иаружиым днаметром 110 мм; песок кварцевый; свежий растительный материал (морковь нлн картофель); пермаиганат калия (0,1 н.); серная кислота (10%-иая); карбоиат кальция; пероксид водорода (0, 1 и.).

2 г сырого картофеля (или моркови) растирают с кварцевым песком в ступке, постепенно добавляя 2—3 мл воды. Для уменьшения кислой реакции добавляют на кончике шпателя карбонат кальция до прекращения выделения пузырьков углекислого газа. Растертую массу количественно переносят в мерную колбу и доводят водой до 100 мл. Смесь оставляют стоять в течение 30—60 мин, после чего ее фильтруют. В коническую колбу на 200 мл берут пипеткой 25 мл 0,1 н. раствора пероксида водорода и добавляют туда же пипеткой 20 мл вытяжки фермента. Через 30 мин действие фермента прекращают прибавлением 5 мл 10%-ного раствора серной кислоты и титруют смесь 0,1 н. раствором перманганата калия (до образования устойчивого в течение примерно 1 мин розового окрашивания). Отмечают количество миллилитров раствора перманганата калия, пошедшего на титрование оставшегося пероксида водорода. Одновременно ставят контроль с инактивированным нагреванием в кипящей водяной бане в течение 5 мин ферментным раствором (20 мл). К этому раствору после охлаждения добавляют 25 мл 0,1 н. раствора пероксида водорода. Смесь оставляют стоять на 30 мин, после чего добавляют 5 мл 10%-ного раствора серной кислоты и титруют 0,1 н. раствором перманганата калия. Отмечают количество миллилитров перманганата калия, пошедшего на титрование всего количества пероксида водорода. По разности между опытным и контрольным титрованием находят количество перманганата, эквивалентное количеству разложенного ферментом пероксида водорода.

Расчет количества пероксида водорода, разложенного ферментом, ведут в соответствии с уравнением реакции:

$$5H_2O_2 + 2KMnO_4 + 3H_2SO_4 \rightarrow 2MnSO_4 + K_2SO_4 + 5O_2 + 8H_2O,$$

согласно которому 1 мл 0,1 н. раствора перманганата калия соответствует 1,7 мг пероксида водорода.

П р и м е р р а с ч е т а: из 1,25 г моркови приготовлена вытяжка каталазы объемом 100 мл: на титрование опытной пробы затрачено 15,5 мл, контрольной — 30,2 мл 0,1 н. раствора перманганата калия. Количество разложенного пероксида водорода в пробе эквивалентно (30,2—15,5) 14,7 мл 0,1 н. раствора перманганата калия и, следовательно, равно (14,7 · 1, 7) 24,99 мг. В 1 г сырой моркови содержится количество каталазы, способное за 30 мин разложить $\left(\frac{24,99 \cdot 100}{20 \cdot 1,25}\right)$ 99,96 мг пероксида водорода, а за 1 мин — (99,96 : 30) 3,33 мг. Так как 1 мкмоль пероксида водорода составляет 0,034 мг, то в 1 г моркови присутствует (3,33 : 0,034) 100 *Е* каталазы.

ПРЕДСТАВИТЕЛИ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ ФЕРМЕНТОВ

ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

Глутаматдегидрогеназа (L-глутамат: НАД$^+$ — оксидоредуктаза; КФ 1. 4. 1. 2) тканей тутового шелкопряда

Оборудованне, реактивы. Термостат на 40° С; прнбор и реактивы для фракционирования белков методом электрофореза в полиакриламидном геле (с. 56); микрофотометр МФ-4 с самопнсцем; пипетки градуированные на 1 и 10 мл; гемолнмфа лнчинок тутового шелкопряда, разбавлениая в 4 раза 2 М раствором сахарозы; L-глутамат натрня (1,47 г L-глутаминовой кнслоты н 0,4 г гндрокснда натрня растворяют в 5 мл днстиллированной воды); НАД — 2 мг; НСТ — 2 мг; ФМС (0,2 мг в 1 мл воды); ЭДТА-фосфатный буфер (рН 7,0; 292 мг этнлендиаминтетраацетата (ЭДТА) растворяют в 100 мл 0,05 М раствора гндрофосфата калия и доводят соляиой кнслотой рН до 7,0).

По окончании электрофореза белков гемолимфы тутового шелкопряда в соответствии с прописью, приведенной на странице 56, гелевую колонку вынимают из стеклянной трубочки, ополаскивают водой и помещают на 10—15 мин при температуре 37°С в инкубационную среду, содержащую 1 мл раствора глутамата натрия, 8 мл ЭДТА-фосфатного буфера, 2 мг НАД и 2 мг НСТ. Через указанный промежуток времени в пробирку добавляют 1 мл раствора ФМС, хорошо перемешивают и вновь смесь выдерживают при 37°С 15—20 мин. Зоны локализации на колонке глутаматдегидрогеназы окрашиваются в синий цвет.

Полученную энзимограмму денситометрируют на микрофотометре МФ-4 с самописцем. Уровень активности каждой формы фермента рассчитывают путем аппроксимирования полученных при денситометрировании пиков по формуле:

$$A = \frac{\lg h}{2} a,$$

где A — активность формы фермента; h — высота пика; a — основание пика.

Суммарную активность фермента в условных единицах определяют, складывая активности отдельных форм.

ТРАНСФЕРАЗЫ

Переаминирование глутаминовой кислоты с пировиноградной кислотой

Оборудованне, реактивы. Оборудование и реактивы, иеобходимые для хроматографни распределення иа бумаге (с. 9); баия водяиая; вороики Бюхиера с иаружным диаметром 100 мм (2 шт.); пнпетки градуироваиные иа 1 мл (5 шт.); смесь стандартиых растворов глутаминовой кислоты и аланина (см. приложенне); мышечная кашица (с. 124); глутамииовая кислота (1%-иая, нейтрализоваиная гидроксидом калия); пнровииоградиая кислота (1%-иая, нейтрализоваиная-

гидроксидом калия; синтез ПВК см. в прнложеинн); гидрокарбоиат калия (0,1%-ный); монобромуксусиая кислота (0,025%-ная), иейтрализованная гидроксидом калия (см. прнложение); уксусиая кислота (2%-ная).

В две пробирки берут по 0,5 мл 1%-ного раствора глутаминовой кислоты, 0,5 мл 1%-ного раствора пировиноградной кислоты, 1 мл 0,1%-ного раствора гидрокарбоната калия и 0,25 мл 0,025%-ного раствора монобромуксусной кислоты. Далее в обе пробирки помещают по 0,5 г свежей мышечной кашицы. Вторую (контрольную) пробу сейчас же нагревают до кипения и осторожно кипятят в течение 1—2 мин. Обе пробирки закрывают пробками и ставят в водяную баню при 38°С на 1,5—2 ч, многократно перемешивая содержимое. По окончании инкубации вынимают пробирки из бани, добавляют в каждую по 0,24 мл уксусной кислоты и кипятят до полного свертывания белков. Содержимое каждой пробирки отфильтровывают в пробирки с той же нумерацией. Закрывают пробирки пробками и оставляют их до следующего занятия в холодильнике. На следующем занятии оба раствора хроматографируют в соответствии с прописью на странице 9.

На хроматограмме должно быть три полосы: одна — для испытуемого раствора, другая — для контрольной пробы и третья — для смеси аланина и глутаминовой кислоты. На каждую полосу следует нанести 0,01—0,02 г раствора. Проявление хроматограммы ведут в течение 24 ч, после чего ее вынимают, сушат и смачивают раствором нингидрина. Отмечают убыль глутаминовой кислоты в опыте по сравнению с контролем и появление аланина.

ГИДРОЛАЗЫ

Ацетилхолинэстераза (ацетилхолин — ацилгидролаза; КФ 3. 1. 1. 7) сыворотки крови

Холинэстераза ускоряет реакцию гидролиза ацетилхолина на холин и уксусную кислоту, в результате чего изменяется pH буферного раствора. Величина изменения pH среды и является мерой активности фермента:

$$[H_3C-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-O(CH_2)_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3]Cl^- + H_2O \rightarrow$$

Ацетилхолинхлорид

$$\rightarrow H_3C-COOH + [HO-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3]Cl^-$$

Холинхлорид

Оборудоваиие, реактивы. Фотоколориметр марки ФЭК-Н-57, пнпетки градуированиые иа 1 мл (6 шт.) и 5 мл; сыворотка крови (приготовлеиие см. с. 48); вероиал-медииаловый буфериый раствор (pH 8,4; 2,06 г меднпала растворяют в 100 мл воды; 82,3 мл этого раствора смешивают с 17,7 мл 0,1 н. раствора соляиой кислоты); феноловый красный (0,02%-ный) в соляной кислоте (0,025 н.); ацетилхолинхлорид (3,5%-иый).

В одну пробирку вносят 1 мл веронал-мединалового буферного раствора, 0,5 мл 3,5%-ного раствора ацетилхолина и 0,1 мл сыворотки; в другую — 1 мл того же буферного раствора, 0,5 мл воды и 0,1 мл сыворотки. Обе пробы инкубируют в течение 1 ч при 37°С. За 2—3 мин до окончания инкубации в каждую пробирку добавляют по 3,5 мл воды и 0,1 мл 0,02%-ного раствора фенолового красного. Пробы колориметрируют в кювете толщиной 10 мм при 536 нм (фильтр № 5). Расчет производят по стандартной кривой, для построения которой готовят индикаторно-буферный ряд с различными значениями pH:

Осиовиой мединаловый раствор (10,3 г медииала в 500 мл воды) (мл)	5,36	5,54	5,81	6,15	6,62	7,16	7,69	8,23	8,71
0,1 н раствор соляиой кислоты (мл)	4,64	4,46	4,19	3,85	3,38	2,84	2,31	1,77	1,29
Зиачеиия pH	7,0	7,2	7,4	7,6	7,8	8,0	8,2	8,4	8,6

К 10 мл каждого буферного раствора добавляют 0,1 мл 0,02%-ного раствора фенолового красного и колориметрируют в тех же условиях, что и опытные пробы (см. выше).

По оси ординат откладывают найденные величины оптической плотности, а по оси абсцисс — соответствующие значения pH раствора. Активность холинэстеразы оценивают по величине изменения pH опытной пробы по сравнению с контрольной.

ЛИАЗЫ

Альдолаза (кетозо-1-фосфат-альдегид-лиаза; КФ 4. 1. 2. 7) сыворотки крови

Альдолазную активность выявляют колориметрическим методом, основанным на определении интенсивности окраски гидразонов, образующихся в результате взаимодействия фосфотриоз (продуктов расщепления фруктозо-1,6-дифосфата) с 2,4-динитрофенилгидразином в щелочной среде. Интенсивность окраски растворов пропорциональна активности фермента.

Оборудование, реактивы. Термостат иа 40°С; фотоэлектроколориметр марки ФЭК-М или ФЭК-Н-57; пипетки градуироваииые иа 1 мл (2 шт.); сыворотка крови (приготовлеиие см. с. 48); иатриевая соль 1,6-фруктозодифосфата (0,005 М) в гидразиие (0,056 М), pH 8,2 (250 мг бариевой соли фруктозолифосфата растворяют в 70 мл воды, добавляют 410 мг гилразиихлорида и доводят pH до 8,2 1 н. раствором гидроксида иатрия, после чего разводят водой до 100 мл); соляиая кислота (2 н.); гидроксид иатрия (0,6 н.); 2,4-дииитрофеиилгидразии (0,1%-ный) в соляиой кислоте (2 н.).

В две пробирки наливают по 0,1 мл сыворотки крови и в одну из них (опытная проба) еще 0,5 мл 0,005 М раствора фруктозо-1,6-дифосфата в гидразине. Обе пробирки помещают в термостат при 37°С на 30 мин. Затем в обе пробирки добавляют по 0,1 мл соляной кислоты (для прекращения реакции), а в пробирку с контрольной пробой еще 0,5 мл 0,005 М раствора фруктозо-1,6-дифосфата. Для развития цветной реакции к обеим пробам приливают по 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина, перемешивают и оставляют на 30 мин при комнатной температуре, после чего добавляют по 4,5 мл 0,6 н. раствора гидроксида натрия и после 20 мин выдерживания в темноте фотометрируют против воды в кювете толщиной 1 см и светофильтром с максимумом поглощения при 536 нм. Активность альдолазы выражают в условных единицах: $A = (E_{оп.} - E_{кон.}) \times \times 100$, где $E_{оп.}$ — экстинкция опытного раствора, $E_{кон.}$ — экстинкция контрольной пробы.

ИЗОМЕРАЗЫ

Определение глюкозофосфат-изомеразы (D-глюкозо-6-фосфат — кетол-изомераза; КФ 5. 3. 1. 9) в сыворотке крови

Оборудоваиие, реактивы. Термостат иа 40°С; центрифуга; фотоэлектроколориметр марки ФЭК-Н-57; склянкн с притертыми пробками (2 шт.); пипетки градуироваииые иа 1, 2, 5 н 10 мл; сыворотка кровн (получение см. с. 48); мединалово-ацетатный буферный раствор (рН 7,4; 9,714 г ацетата иатрия и 14,714 г медииала растворяют в воде и доводят объем до 500 мл); субстрато-буферная смесь (смешивают 8,33 мл 0,03 М раствора двунатриевой солн глюкозо-6-фосфата с 25 мл медниалово-ацетатиого буфера, рН 7,4, н 25 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты; доводят водой до 100 мл; хранят на холоде); трихлоруксусиая кислота (10%-иая); резорцин (0,1%-иый); соляиая кнслота (0,1 н. н 10 н.).

В две пробирки наливают по 0,5 мл сыворотки крови и в одну из них (опытная проба) еще 1 мл субстратно-буферной смеси. Перемешивают и обе пробирки помещают в термостат при 37°С на 30 мин. Через указанный промежуток времени в контрольную пробу приливают 1 мл субстратно-буферной смеси, а затем сразу же в обе пробирки — по 1,5 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты для прекращения реакции. После перемешивания смесь центрифугируют. Из каждой пробирки отбирают по 1 мл надосадочной жидкости, переносят ее в склянку с притертой пробкой, добавляют 1 мл 0,1%-ного раствора резорцина вместе с 3 мл 10 н. раствора соляной кислоты. Смесь энергично встряхивают и оставляют при комнатной температуре. Спустя 5 мин появляется розовая окраска, интенсивность которой пропорциональна количеству образовавшегося фруктозо-6-фосфата. Измеряют интенсивность окраски на фотоэлектроколориметре при 413 нм (против воды) в кювете толщиной 10 мм. Активность фермента пропорциональна разности экстинкций между опытным и контрольным определениями, и ее выражают в условных единицах: $A = (E_{оп.} - E_{кон.}) \cdot 100$.

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И ИХ ОБМЕН

ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Согласно современным представлениям, нуклеиновым кислотам принадлежит ведущая роль в осуществлении специфического биосинтеза макромолекул, обеспечении процессов морфогенеза и передачи наследственной информации.

Для изучения природы и свойств нуклеиновых кислот необходимо выделение их из ткани в нативном, по возможности неизменном состоянии. Обычно этому препятствуют главным образом два обстоятельства; во-первых, крупные молекулы нуклеиновых кислот упакованы в структурах и прочно связаны с другими химическими компонентами клетки, в частности с белками; во-вторых, в клетке всегда есть активные нуклеазы, заключенные преимущественно в лизосомах и переходящие в свободное состояние при гомогенизации тканей. Таким образом, при выделении нуклеиновых кислот необходимо особое внимание уделять инактивации нуклеаз, полноте гомогенизации и очистке препарата от примесей (белки, полисахариды, полифосфаты и др.).

В настоящее время наиболее надежным методом получения препаратов нуклеиновых кислот является фенольно-детергентный метод. Сущность этого метода и его многочисленных модификаций заключается в том, что извлечение нуклеиновых кислот достигается фенольной обработкой гомогената в присутствии детергентов и ингибиторов нуклеаз.

ПОЛУЧЕНИЕ РНК и ДНК ИЗ ЖИВОТНЫХ ТКАНЕЙ ФЕНОЛЬНЫМ МЕТОДОМ (ПО КИРБИ-ГЕОРГИЕВУ)

Метод предназначен для раздельного получения свободных от белка РНК и ДНК в высокополимерном состоянии.

Гомогенизированные ткани животных суспендируют в 0,14 М растворе хлорида натрия. При последующем встряхивании полученной суспензии с водонасыщенным фенолом происходит депротеинизация нуклеопротеидов: рибонуклеопротеидов — при pH 6,0, дезоксирибонуклеопротеидов — при pH 8,3. РНК и ДНК последовательно и раздельно друг от друга переходят в водные растворы,

из которых их выделяют соответствующей обработкой. Фенол дезактивирует рибо- и дезоксирибонуклеазы, что предотвращает деполимеризацию нуклеиновых кислот. Во избежание разложения или хотя бы некоторой деполимеризации нуклеиновых кислот все операции вплоть до окончательного осаждения нуклеиновых кислот спиртом проводят при 0—3°С. Все реактивы, посуда и гомогенат тканей должны находится на льду. Если ткани выделяют заранее, то их хранят в замороженном состоянии (не более 2—3 дней).

Оборудование, реактивы. Центрифуга рефрижераторная; гомогенизатор; встряхиватель; эксикатор с краном; шприц стеклянный на 50 мл; ступка фарфоровая (диаметр 110 мм); цилиндр измерительный с носиком на 100 мл; воронка делительная на 100 мл; колбы конические на 100 и 250 мл (по 3 шт.); стаканчики для взвешивания (2 шт.); пробирки стеклянные химические; марля; фенол, свежеперегнанный и насыщенный водой (см. приложение); хлорид натрия (0,14 М); хлорид натрия (0,14 М), содержащий 0,05 моль цитрата калия в 1 л раствора; хлорид натрия (4 М); хлорид натрия (1 М); эфир диэтиловый; этиловый спирт (96%-ный); абсолютный этанол; ледяная уксусная кислота; фенол водонасыщенный с pH 8,3, содержащий 0,3 моль парааминосалициловой кислоты в 1 л раствора (см. приложение); сухой лед; толуол.

Выделение и гомогенизация ткани. После умерщвления животного ткань или орган (печень[1], селезенка, мозг) быстро выделяют и кладут в сухой лед. После охлаждения отвешивают 10 г ткани, измельчают ее ножницами, обливают в ступке 10—20 мл охлажденного 0,14 М раствора хлорида натрия, содержащего 0,05 моль цитрата калия в 1 л раствора (для инактивации дезоксирибонуклеазы). Смесь растирают в ступке 5—10 мин до тонкой суспензии, постепенно добавляя раствор хлорида натрия до общего объема гомогената в 100 мл. Для измельчения можно пользоваться гомогенизатором Уоринга или Поттера — Эльвегейма. Полученный тем или иным путем гомогенат фильтруют через 1—2 слоя марли.

Разделение РНК и ДНК. К фильтрату добавляют равный объем водонасыщенного фенола, имеющего pH 6,0 ($\sim$ 100 мл). Смесь встряхивают в течение 40 мин; РНК при действии фенола депротеинизируется и переходит в водный раствор.

Смесь центрифугируют при 0—3°С в течение 40 мин при 3000 *g*. Образуются 4 слоя: первый (верхний) — водный слой, в котором растворена РНК и полисахариды (гликоген); второй — белый вязкий, содержащий ДНК-протеид и нерастворимые в феноле белки; третий — фенольный слой, содержащий растворимые в феноле белки; четвертый — коричневатый осадок, содержащий остатки ткани, небольшую часть ДНК и денатурированные белки.

Водный слой осторожно отсасывают шприцем и сохраняют. Фенольный слой отбрасывают. Ко второму слою и отдельно к осадку в четвертом слое приливают по 50 мл водонасыщенного фе-

[1] Рекомендуется не кормить животное в течение 2—3 дней перед опытом для уменьшения содержания гликогена в печени.

нола с pH 6,0, перемешивают и добавляют по 50 мл 0,14 *М* раствора хлорида натрия. Каждую смесь встряхивают 30 мин и затем центрифугируют 30 мин при 3000 *g*. Водные слои после центрифугирования присоединяют к первоначальному водному слою, получают раствор депротеинизированной РНК (I). Фенольный слой и осадок отбрасывают. Второй, промежуточный слой, содержащий ДНК-протеид, для очистки от остатков РНК еще раз встряхивают 30 мин со смесью 50 мл фенола (pH 6,0) и 50 мл 0,14 *М* раствора хлорида натрия и центрифугируют 30 мин при 5000 *g*. Отделяют только промежуточный, второй, слой, в котором находится ДНК-протеид (II); все остальные слои отбрасывают.

Выделение РНК из водного раствора. К водному раствору (I), содержащему РНК, для ее более полной депротеинизации добавляют половинный объем водонасыщенного фенола с pH 6,0. Смесь встряхивают 20 мин и центрифугируют 30 мин при 3000 *g*. Собирают только верхний, водный слой, все остальное отбрасывают. К водному раствору прибавляют 1,5 объема этанола (до концентрации ~57%) и оставляют в холодильнике на 1 ч (не более, во избежание денатурации РНК). Выпавший осадок отделяют центрифугированием и растворяют его в минимальном количестве воды. Нерастворившуюся часть отделяют центрифугированием и отбрасывают. К раствору добавляют 1,5—2 объема 4 *М* раствора хлорида натрия (до конечной 1 *М* концентрации хлорида натрия). В осадок выпадает высокополимерная РНК. Смесь оставляют на 2 ч в холодильнике (можно оставить на ночь)[1]. Осадок рибонуклеата натрия отделяют центрифугированием от низкополимерной РНК, промывают 1 *М* раствором хлорида натрия и растворяют в воде. $^1/_5$ водного раствора РНК сохраняют для химических анализов в холодильнике с добавлением нескольких капель толуола. Из остальной части водного раствора осаждают РНК спиртом, взятым в двойном объеме. Для полноты осаждения смесь оставляют в холодильнике на 1 ч, после чего осадок отделяют центрифугированием, спирт сливают, а осадок промывают сначала 80%-ным спиртом, затем абсолютным спиртом и, наконец, диэтиловым эфиром, каждый раз центрифугируя 5 мин при 3000 *g*. Эфир сливают, а осадок высушивают в эксикаторе над хлоридом кальция.

Выделение ДНК. Промежуточный слой, в котором сконцентрирован ДНК-протеид (II), смешивают со 100 мл водонасыщенного фенола (pH 8,3), содержащего парааминосалициловую кислоту. К смеси добавляют равный объем воды. Смесь в течение 40 мин встряхивают не очень сильно, лучше вручную, круговыми движениями. При этом ДНК-протеид распадается и ДНК переходит в водорастворимое состояние. На этой стадии

---

[1] В случае высокого содержания гликогена в растворе осаждение 1 *М* раствором хлорида натрия повторяют, так как гликоген растворим в 1 *М* растворе хлорида натрия.

выделения ДНК раствор может быть оставлен на ночь. Смесь центрифугируют при 6000 g в течение 1 ч. Образуется 3 слоя. В верхнем, водном слое находится свободная ДНК. Этот слой собирают, а объединенные второй и третий слои встряхивают 20 мин со 100 мл 0,14 М раствора хлорида натрия и после центрифугирования водный слой соединяют с первоначальным. Для полной депротеинизации обрабатывают объединенный водный слой 50 мл водонасыщенного фенола (pH 8,3), встряхивают 20 мин и центрифугируют 30 мин при 6000 g. Фенол из водного слоя экстрагируют полуторным объемом диэтилового эфира, содержащего 6—7 капель на 100 мл эфира ледяной уксусной кислоты для нейтрализации фенола. Водный и эфирный слои отделяют с помощью делительной воронки, эфирный слой отбрасывают. Если после встряхивания с эфиром образовалась стойкая эмульсия, то ее разделяют центрифугированием. Обработку эфиром повторяют еще 1—2 раза для более полного извлечения фенола.

ДНК осаждают из водного слоя спиртом, который добавляют в количестве 2—2,5 объемов (до исчезновения опалесценции); ДНК осаждается в виде нитей. Для очистки ДНК ее переосаждают спиртом из 0,14 М раствора хлорида натрия. Для этого нити ДНК наматывают на палочку, подсушивают фильтровальной бумагой и переносят в 0,14 М раствор хлорида натрия. После растворения ДНК осаждают добавлением 2,5 объемов спирта, выдерживая смесь в холодильнике около 1 ч. Осадок отделяют центрифугированием, промывают 80%-ным спиртом, затем абсолютным спиртом, эфиром и высушивают в вакууме над хлоридом кальция. При использовании ДНК для последующих опытов ее растворяют в 0,14 М растворе хлорида натрия.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ МИКРООРГАНИЗМОВ (ПО МАРМУРУ)

Это один из наиболее распространенных методов выделения суммарной ДНК, обладающей биологической активностью. Сущность его состоит в том, что диссоциацию дезоксирибонуклеопротеида на ДНК и белок осуществляют с помощью 1 М раствора перхлората натрия. После удаления белков смесью хлороформа с изоамиловым спиртом РНК разрушают РНКазой (КФ 2.7.7.16), а ДНК осаждают изопропанолом. Метод разработан для выделения ДНК из бактерий и вирусов. В настоящее время есть ряд модификаций метода Мармура применительно к растительным и животным объектам.

Оборудоваине, реактивы. Цeнтрифуга рефрижераторная; мешалка механическая; термостат; баня водяная; шприц стеклянный на 100 мл; ступка фарфоровая (диаметр 110 мл); цилиндр измерительный с носиком; колбы конические на 200 мл (5 шт.); пипетки с одной меткой на 1, 5 и 10 мл; додецилсульфат натрия (25%-ный); перхлорат натрия (5 М); смесь хлороформа и изоамилового спирта (24 : 1); стандартный солевой раствор (0,15 М хлорид натрия и 0,015 М цитрата натрия в 1 л, pH 7,0); стандартный солевой раствор, разбавленный в 10 раз; стандартный солевой раствор концентрированный, в котором концентрация компо-

нентов в 10 раз больше, чем в стандартном солевом растворе; хлорид натрия (0,15М), содержащий 0,1 моль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) в 1 л раствора, pH 8; ацетат натрия (0,3М) в ЭДТА (0,001М), pH 7; рибонуклеаза (КФ 2.7.7.16); этанол (70%-ный и 96%-ный); изопропанол; хлороформ; хлорид натрия (0,15М).

Из бактериальной культуры (E. coli, Saccharomyces cerevisiae, Neurospora crassa и др.), содержащей 2—3 г сырых клеток, находящихся в логарифмической фазе роста, бактериальные клетки отделяют центрифугированием и промывают их один раз 50 мл стандартного солевого раствора. Затем клетки суспендируют в 25 мл 0,15 М раствора хлорида натрия, содержащего 0,1 моль ЭДТА, pH 8,0. Добавляют 2 мл 25%-ного раствора додецилсульфата натрия и помещают в водяную баню, нагретую до 60°С, на 10 мин для лизиса клеток. Отмечается увеличение вязкости раствора. После охлаждения добавляют 5 М раствор перхлората натрия до конечной концентрации 1 М. К полученному вязкому раствору приливают равный объем смеси хлороформ — изоамиловый спирт (24 : 1). Полученную суспензию перемешивают в течение 30 мин, а затем центрифугируют при 5000—10 000 g в течение 5—10 мин. В дальнейшем во всех случаях центрифугирование проводят при этих же условиях. В результате центрифугирования образуется три слоя. Верхний, водносолевой слой, содержащий нуклеиновые кислоты, отсасывают. Для осаждения нуклеиновых кислот к нему добавляют 2 объема охлажденного 96%-ного этанола. Нити ДНК собирают наматыванием их на палочку и переносят в 10—15 мл стандартного солевого раствора, разбавленного в 10 раз. Иногда из-за низкой концентрации нуклеиновых кислот в растворе нитей ДНК не образуется, но получается опалесцирующий раствор. В этом случае раствор центрифугируют и осажденную ДНК растворяют в минимальном количестве разбавленного стандартного солевого раствора.

К полученному раствору ДНК прибавляют $^1/_{10}$ объема концентрированного стандартного солевого раствора. Когда раствор ДНК станет однородным, к нему приливают равный объем смеси хлороформа с изоамиловым спиртом (24 : 1). Полученную эмульсию перемешивают 15 мин, центрифугируют и отделяют водносолевой слой. Повторяют депротеинизацию до тех пор, пока после центрифугирования на границе водной и органической фазы не перестанет образовываться слой денатурированного белка. После всех депротеинизаций ДНК осаждают из водной фазы 2—2,5 объемами 96%-ного этанола. Осадок ДНК отделяют центрифугированием и растворяют в стандартном солевом растворе.

Для очистки от РНК к полученному раствору ДНК добавляют РНКазу (КФ 2.7.7.16) до конечной концентрации 50 мкг в 1 мл. Рибонуклеазу предварительно прогревают 10 мин при 80°С в 0,15 М растворе хлорида натрия, чтобы инактивировать возможную примесь ДНКазы (КФ 3.1.4.5). Инкубацию раствора ДНК с РНКазой проводят при 37°С в течение 30 мин и после охлаждения до комнат-

ной температуры депротеинизируют его 2—3 раза смесью хлороформ-изоамиловый спирт, как описано выше. После заключительной депротеинизации ДНК из водно-солевого слоя осаждают 2—2,5 объемами охлажденного 96%-ного этанола. Осадок ДНК отделяют центрифугированием. Затем растворяют его в 9 мл разбавленного стандартного солевого раствора. Добавляют 1 мл 3 М раствора ацетата натрия в 0,001М ЭДТА (pH 7,0) и при энергичном перемешивании добавляют по каплям 0,54 по отношению к раствору ДНК объема изопропанола. При этом осаждается только ДНК, а деполимеризованная РНК и полисахариды остаются в растворе.

Осажденную ДНК наматывают на палочку, промывают 70%-ным этанолом, затем 96%-ным этанолом и растворяют в минимальном объеме разбавленного стандартного солевого раствора. Для стабилизации молекул ДНК к раствору добавляют $^1/_{10}$ часть концентрированного стандартного солевого раствора и несколько капель хлороформа. Приготовленный таким образом раствор ДНК может храниться в холодильнике (5°С) в течение нескольких месяцев.

Некоторые виды бактерий, устойчивых к лизису с помощью додецилсульфата натрия, лизируют с помощью лизоцима, добавляя додецилсульфат натрия сразу после лизиса для инактивации нуклеаз. Если бактерии устойчивы к обеим лизирующим агентам, то их клетки разрушают растиранием со стеклянным или алюминиевым порошком в присутствии додецилсульфата натрия.

Метод Мармура позволяет получить ДНК с относительной молекулярной массой $8—12 \cdot 10^6$ и 0,3—0,5%-ным содержанием пептидного материала.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ФИКСИРОВАННОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ХЛОРОФОРМНЫМ МЕТОДОМ

Указанный метод позволяет выделить суммарную ДНК из фиксированного биологического материала. Фиксацию живого материала (личинки, куколки, бабочки насекомых либо их ткани) проводят двойным по отношению к массе живого материала объемом 96%-ного этанола, содержащего 0,1 моль триса в 1 л раствора. Через сутки фиксирующую смесь сливают и заменяют свежей порцией в том же соотношении. Фиксированный таким образом материал можно хранить в холодильнике в течение нескольких месяцев.

Оборудование, реактивы. Центрифуга рефрижераторная марки ЦЛР-1; гомогенизатор; термостат; водяная баня; шприц стеклянный на 20 мл; стеклянные палочки (10 шт.); пипетки градуированные на 5 мл (2 шт.); химические стаканы на 50 мл (10 шт.); экстрагирующий буфер (0,15М хлорид натрия, 0,15М цитрат натрия, 0,1М трис, 0,1М ЭДТА в 1 л дистиллированной воды, pH 8,2); стандартный солевой раствор (0,15М хлорид натрия и 0,015М цитрат натрия в 1 л дистиллированной воды, pH 7,0); стандартный солевой раствор (разбавлен-

ный в 10 раз); ацетат натрия (3М), содержащий 0,001 моль трилона Б в 1 л раствора, pH 7,0); рибонуклеаза (КФ 2.7.7.16); проназа Р (45.000 ед/г, Ferak Berlin); изопропанол; смесь хлороформа и изоамилового спирта (24 : 1 по объему); додецилсульфат натрия (10%-ный в 45%-ном этаноле); этанол (96%-ный, 70%-ный перегнанный, 45%-ный).

Биологический материал сначала отделяют от фиксирующей жидкости фильтрованием или центрифугированием, а затем для удаления липидов гомогенизируют в двойном объеме 96%-ного этанола в течение 10 мин при скорости вращения ножей гомогенизатора 8000 об/мин. Полученный гомогенат центрифугируют (8000 *g*, 15 мин, 4°С), спирт сливают, а осадок гомогенизируют в двойном объеме экстрагирующего буфера в течение 10 мин при скорости вращения ножей гомогенизатора 8000 об/мин. Полученный гомогенат центрифугируют (8000 *g*, 15 мин, 4°С). Указанную операцию проводят 3—4 раза для полной отмывки ткани от этанола. Экспериментально показано, что в этих условиях ДНК не экстрагируется и не обнаруживается в надосадочной жидкости. Отмытый от этанола материал суспендируют в новой порции экстрагирующего буфера (двойной объем буфера по отношению к навеске ткани), к которому для лизиса клеток и депротеинизации ДРНП добавляют додецилсульфат натрия (конечная концентрация 0,5%) и проназу (конечная концентрация 200 мкг/мл). Полученную смесь инкубируют при 37°С в течение 18 ч. Дальнейшее выделение ДНК и очистку ее проводят в соответствии с методом Мармура.

После инкубации гомогенат депротеинизируют двойным объемом смеси — хлороформ: изоамиловый спирт (в соотношении 24 : 1) в течение 20 мин, а затем центрифугируют при 4000 *g*, 4°С, 20 мин. Водную фазу, содержащую ДНК, отбирают и вновь депротеинизируют до исчезновения слоя денатурированных белков на границе водной и органической фазы, полученной в процессе центрифугирования этой смеси. ДНК из объединенных водных растворов осаждают двойным объемом 96%-ного этанола, охлажденного до 4°С, Осадок ДНК отделяют центрифугированием.

Для освобождения препарата ДНК от РНК инкубируют раствор ДНК с препаратом панкреатической РНКазы (КФ 2.7.7.16). С этой целью осадок ДНК растворяют в минимальном объеме стандартного солевого раствора, содержащего 200 мкг/мл РНКазы. Предварительно раствор РНКазы прогревают при 80°С в течение 15 мин для инактивации возможных примесей ДНКаз в препарате РНКазы. Инкубацию раствора ДНК с РНКазой проводят в течение 1 ч при 37°С. По истечении этого времени к раствору добавляют проназу до конечной концентрации 200 мкг/мл и инкубируют раствор ДНК с проназой в течение 2 ч при 37°С для удаления оставшихся примесей белков и РНКазы.

После инкубации ДНК из раствора осаждают двойным объемом охлажденного 96%-ного этанола, осадок отделяют центрифугированием, растворяют в разведенном в 10 раз стандартном солевом

растворе и добавляют раствор, содержащий 3 моль ацетата натрия и 0,001 моль трилона Б в 1 л (рН 7,0) из расчета 1 мл последнего раствора на 9 мл раствора ДНК. Затем при энергичном помешивании прибавляют по каплям один объем охлажденного до 4°С изопропанола. При этом осаждается в основном ДНК, которую отделяют центрифугированием. Осадок ДНК вновь растворяют в стандартном солевом растворе и проводят многократно депротеинизацию смесью — хлороформ: изоамиловый спирт до полного удаления белковых примесей. ДНК из раствора осаждают двойным объемом охлажденного 96%-ного этанола. Осадок ДНК промывают перегнанным 70%-ным этанолом и хранят в холодильнике при 4°С в течение продолжительного времени.

ВЫДЕЛЕНИЕ ТОТАЛЬНОЙ РНК ИЗ ГРЕНЫ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА (ПО ШЕРРЕРУ)

Принцип метода заключается в том, что при обработке ткани водонасыщенным фенолом, содержащим 0,5% додецилсульфата натрия, в водную фазу при 4°С переходит и ДНК и РНК. Но при нагревании до 50—60°С ДНК остается в связанном состоянии и в водную фазу переходит лишь РНК. Этот метод широко используют для выделения тотальной РНК из любых животных тканей. Удобным объектом является грена тутового шелкопряда.

Оборудование, реактивы. Центрифуга рефрижераторная; спектрофотометр; баня водяная; шприц стеклянный на 50 мл; стакан стеклянный лабораторный высокий с носиком; воронка Бюхнера (диаметр 65 мм); ступка фарфоровая (диаметр 110 мм); колба коническая на 200 мл; гидроксид натрия (2%-ный); додецилсульфат натрия (0,2%-ный); этанол (96%-ный); хлорная кислота (0,5 н.); фенол свежеперегнанный водонасыщенный (см. приложение); поливинилсульфат; ацетатный буфер (0,01 М) рН 5,2 (смешивают 10,5 мл 0,02М раствора уксусной кислоты и 39,2 мл 0,02М раствора ацетата натрия и доводят водой до объема 100 мл); хлорид магния; реактив для растворения РНК, содержащий хлорид натрия (0,05 моль), ацетат натрия (0,01 моль) и хлорид магния (0,0001 моль) в 1 л; азот жидкий; лед.

Грену тутового шелкопряда предварительно промывают для инактивации поверхностных нуклеаз сначала 2%-ным водным раствором гидроксида натрия, затем 0,2%-ным раствором додецилсульфата натрия и в заключение дистиллированной водой. Эту операцию проводят на воронке Бюхнера; на 1 г грены берут по 50 мл указанных растворов. После промывки грену подсушивают на воздухе.

1 г промытой грены тутового шелкопряда (или любой животной ткани) помещают в фарфоровую ступку, измельчают с жидким азотом в тонкий порошок, после чего растирают в ступке с 10 мл 0,01 М ацетатного буфера (рН 5,2), содержащего 0,001 моль хлорида магния, 0,5% додецилсульфата натрия и 2 мкг/мл поливинилсульфата, в течение 30 мин при повторном замораживании и оттаивании. Полученную вязкую суспензию переносят в стакан, прибавляют 10 мл свежеперегнанного водонасыщенного горячего

фенола (60°C) и взбалтывают в течение 3 мин на водяной бане, нагретой до 60°C. Смесь быстро охлаждают в ледяной бане и центрифугируют при 4500 g в течение 30 мин при 4°C. В результате центрифугирования образуются три слоя: водный, промежуточный и фенольный. Водный слой осторожно отсасывают шприцем в колбу и дважды обрабатывают горячим водонасыщенным фенолом (60°C), проводя каждый раз быстрое охлаждение и центрифугирование при 4500 g в течение 30 мин при 4°C. После центрифугирования водный слой отсасывают и обрабатывают далее, а фенольный отбрасывают.

Для осаждения РНК к водному слою добавляют два объема 96%-ного этанола. Осадок РНК формируется в течение нескольких часов при 0°C, после чего его отделяют центрифугированием (4500 g, 10 мин, 0°C), спирт отсасывают, а осадок РНК растворяют в 5 мл 0,05 М раствора хлорида натрия, содержащего 0,01 моль ацетата натрия и 0,0001 моль хлорида магния в 1 л раствора. Из полученного раствора РНК снова осаждают двумя объемами 96%-ного этанола. Осадок РНК выпадает за 1 ч при —10°C. Его отделяют центрифугированием, спирт отбрасывают, а осадок снова растворяют в 5 мл раствора, содержащего хлорид натрия, ацетат натрия и хлорид магния. Из полученного раствора отбирают 0,1 мл и определяют содержание РНК (с. 166). Из оставшегося раствора РНК осаждают спиртом, отделяют центрифугированием и хранят в холодильнике. Из 1 г грены получают 1,5—1,8 мг РНК.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ РИБОСОМАЛЬНЫХ И ТРАНСПОРТНЫХ РНК В ГРЕНЕ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Для фракционирования РНК используют ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы, колоночную хроматографию, электрофорез на твердых носителях (крахмал, агар, агароза, полиакриламидный гель и др.). Особого внимания из перечисленных методов заслуживает метод электрофореза в полиакриламидном геле, который наряду с интенсивным использованием для фракционирования белков в последние годы все более широко применяется также для фракционирования нуклеиновых кислот. Преимущество этого метода состоит в том, что можно контролировать величину пор синтетического геля и проводить анализ одновременно с большим количеством образцов. Электрофорез в полиакриламидном геле с концентрацией акриламида 2,4% позволяет разделить суммарную РНК на три фракции: две высокомолекулярные и одну низкомолекулярную.

Оборудование, реактивы. Спектрофотометр; микрофотометр; универсальный источник питания; прибор для электрофореза; шприц стеклянный на 50 мл; трубки стеклянные с внутренним диаметром 0,5—0,6 см; колбы мерные на 100 и 1000 мл; пипетки градуированные на 0,1; 1 и 5 мл; препарат РНК, выделенный по методу Шеррера; цианогум-41 (или акриламид и N,N'-метиленбисакриламид):

тетраметилэтилендиамин (ТЭМЭД); персульфат аммония (10%-ный); сахароза (40%-ная); бромфеноловый синий (0,25%-ный); *трис*-ацетатный буфер, pH 7,8 (0,12 моль триоксиметиламинометана, 0,06 моль ацетата натрия, 0,003 моль Na-соли·ЭДТА растворяют в дистиллированной воде, ледяной уксусной кислотой (~6 мл) доводят до pH 7,8 и разводят дистиллированной прокипяченной водой до 1 л); хлорная кислота (0,5 н.); уксусная кислота (1М); метиленовый синий (0,2%-ный) в ацетатном буфере (0,4М).

Приготовление геля. Для приготовления геля используют цианогум-41, представляющий собой смесь 95%-ного акриламида и 5%-ного N, N′-метиленбисакриламида. Фракционирование суммарной РНК грены тутового шелкопряда, выделенной по методу Шеррера, проводят в полиакриламидном геле с концентрацией акриламида 2,4%. К 2,53 г цианогума-41 (или к 2,4 г акриламида и 0,13 г N, N′-метиленбисакриламида) прибавляют 33,3 мл *трис*-ацетатного буфера (pH 7,8), 50 мл дистиллированной воды, 0,08 мл ТЭМЭД. Все тщательно перемешивают и вносят 0,8 мл 10%-ного раствора персульфата аммония, доливают воду до метки (100 мл). Еще раз хорошо перемешивают и заполняют этим раствором стеклянные трубки для электрофореза с внутренним диаметром 0,5—0,6 см и длиной 7—8 см. Процесс полимеризации проводят без доступа кислорода, для чего после добавления в колонку полимеризуемой смеси на нее наслаивают буферный раствор. Перед заполнением электрофоретической камеры буферным раствором *трис*-ацетатный буфер (pH 7,8) разбавляют водой в отношении 1 : 2.

Нанесение образца РНК на гель. После того как гель заполимеризовался, на его поверхность наслаивают 0,01—0,05 мл раствора, содержащего 30—60 мкг РНК, 40%-ный раствор сахарозы (конечная концентрация ее 20%) и 0,01 мл 0,25%-ного водного раствора бромфенолового синего. Сахароза повышает плотность раствора РНК, вносимого в колонку, по сравнению с плотностью буфера и обеспечивает надежный контакт испытуемого образца с поверхностью геля.

Концентрацию РНК в испытуемой смеси определяют следующим образом: к 0,1 мл раствора, содержащего РНК, добавляют 5 мл 0,5 н. раствора хлорной кислоты и проводят гидролиз на кипящей водяной бане в течение 20 мин. Затем измеряют оптическую плотность гидролизата на спектрофотометре при 270 и 290 нм. Содержание РНК определяют по формуле:

$$C_{\text{мкг/мл}} = \frac{(E_{270} - E_{290}) \cdot 10{,}5}{0{,}19},$$

где C — концентрация РНК (в мкг/мл); E — оптическая плотность при соответствующей длине волны; 0,19 — коэффициент, соответствующий содержанию 1 мкг РНК в 1 мл раствора, полученный при замере на спектрофотометре содержания фосфора нуклеиновых кислот указанной концентрации; 10,5 — пересчетный коэффициент, выведенный на основании теоретического расчета содержания фосфора в РНК.

П р о в е д е н и е э л е к т р о ф о р е з а и о б н а р у ж е н и е Р Н К. Электрофорез проводят в приборе, описанном ранее (с. 54), при силе тока 5 мА на колонку и температуре 0—3°С в течение 60 мин. После электрофореза гели извлекают из трубок, фиксируют и окрашивают. Фиксацию проводят 1 М раствором уксусной кислоты в течение 15 мин, а окрашивание — 0,2%-ным раствором метиленового синего в 0,4 М ацетатном буфере (рН 4,7) в течение 4 ч. Краситель с той части колонки, которая не содержала нуклеиновых кислот, многократно отмывают водой в течение 8—12 ч.

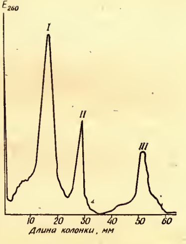


Рис. 38. Денситограмма, снятая с электрофореграммы РНК из диапаузирующей грены тутового шелкопряда (2,4%-ный полиакриламидный гель, *трис*-ацетатный буфер, рН 7,8): I—26S РНК; II—19S РНК; III — 4S РНК.

Полученные электрофореграммы зарисовывают на миллиметровой бумаге, фотографируют и денситометрируют с помощью микрофотометра МФ-4 или аналогичного ему (рис. 38). Площадь пика, соответствующую каждой фракции РНК, высчитывают по формуле:

$$A = \frac{\lg h}{2} \cdot a,$$

где A — содержание фракции РНК в условных единицах; $\lg h$ — десятичный логарифм высоты пика; a — основание пика (в мм).

Суммируя величины A, полученные для всех фракций, находят общее содержание РНК в условных единицах и рассчитывают далее процентное содержание каждой фракции РНК. Зная количество РНК в образце, нанесенном на колонку, вычисляют содержание каждой фракции РНК (в мкг и процентах). Пример расчета:

№ фракции	Вид РНК	h	$\lg h$	a	A	Содержание РНК (в % от общей РНК)
1	рРНК	154	2,1875	31	33,91	52,03
2	рРНК	112	2,0492	17	17,42	26,73
3	тРНК	70	1,8451	15	13,84	21,24
	Всего				65,17	

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕПАРАТОВ РНК И ДНК

Чистоту выделенных препаратов нуклеиновых кислот определяют по спектральной кривой поглощения в ультрафиолете и по величинам отношений $E_{260} : E_{230}$ и $E_{260} : E_{280}$. Для препаратов нуклеиновых кислот, достаточно хорошо очищенных от примесей белков и полисахаридов, эти показатели должны быть в пределах 2,1—2,4. Качественно белок в препаратах определяют по биуретовой реакции, количественно — по методу Лоури. Содержание белка в препаратах ДНК и РНК, полученных из тканей животных, составляет менее 0,7%. Полимерность и нативность полученных препаратов нуклеиновых кислот определяют измерением их вязкости, гиперхромного эффекта и коэффициента седиментации.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФОСФОРА В НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ

Содержание фосфора в нуклеиновых кислотах довольно постоянно: в молекулах ДНК оно составляет 9,8—10,1%, РНК — от 9,1 до 9,66%. По содержанию фосфора можно судить о степени очистки нуклеиновых кислот в процессе их выделения из тканей. Содержание фосфора в ДНК и РНК определяют по методу Фиске — Суббароу.

На микроаналитических весах взвешивают около 2 мг РНК или ДНК, минерализуют их в тугоплавкой пробирке с 1,5 мл 10 н. серной кислоты. Дальнейший анализ ведут в соответствии с прописью, приведенной на странице 179.

Содержание фосфора рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{a \cdot E_1 \cdot V \cdot 100}{E \cdot V_1 \cdot b},$$

где C — содержание фосфора в нуклеиновой кислоте (в %); a — число миллиграммов P в стандартном растворе (в 10 мл); E и E_1 — оптическая плотность (экстинкция) стандартного и исследуемого растворов; V — объем исследуемого раствора, взятый для определения фосфора (2 мл); V_1 — весь объем исследуемого раствора (10 мл); b — масса нуклеиновой кислоты (в мг).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕЛИЧИНЫ ГИПЕРХРОМНОГО ЭФФЕКТА

Известно, что в ультрафиолетовой области спектра ДНК поглощает ультрафиолетовые лучи с максимумом при 260 нм примерно на 40% меньше, чем смесь нуклеотидов, характерная для данного образца ДНК. Этот эффект, называемый гиперхромным, обусловлен упорядоченным (параллельным) расположением азотистых оснований в цепи ДНК, допускающим комплементарные взаимодействия между основаниями. При денатурации ДНК

водородные связи, стабилизирующие азотистые основания в определенном положении, разрушаются, что приводит к увеличению поглощения в ультрафиолетовой области спектра, равному при максимальном нарушении структуры ДНК 40% по сравнению с нативными образцами ДНК.

Таким образом, величина поглощения (E_p) на 1 моль фосфора ДНК при стандартной ширине кюветы (1 см) может служить одним из критериев нативности ДНК. Нативные образцы ДНК имеют значение $E_p = 6200 - 6600$. Более высокие значения E_p характеризуют денатурационные сдвиги в структуре ДНК.

Оборудование, реактивы. Спектрофотометр; 0,003%-ный (не выше) раствор ДНК в 0,2 *М* растворе хлорида натрия.

В кювету наливают 4 мл раствора ДНК и определяют оптическую плотность (D) при длине волны 258—260 нм и температуре 25°С. Значение E_p рассчитывают на отрезок ДНК, содержащий 1 моль фосфора при ширине кюветы в 1 см по формуле:

$$E_p = \frac{D}{C_p \cdot l},$$

где D — экстинкция раствора ДНК; C_p — молярная концентрация фосфора в растворе, рассчитанная на основании ранее найденного процентного содержания фосфора в ДНК; l — ширина кюветы (в см).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ «ПЛАВЛЕНИЯ» ВОДОРОДНЫХ СВЯЗЕЙ

Соответствующие пары азотистых оснований нативной ДНК упорядоченно связаны между собой водородными связями, температура «плавления» которых носит характер одномоментного кооперативного процесса. Поэтому при исследовании зависимости E_p от температуры в случае нативных образцов ДНК наблюдается ярко выраженный фазовый переход, т. е. в узком температурном интервале происходит резкий прирост значения E_p. В денатурированных образцах ДНК, где водородные связи неупорядочены, последние разрушаются постепенно, при разных температурах.

Таким образом, исследование температурных зависимостей E_p является одним из тестов на нативность ДНК. Замечено, что значение температуры «плавления» ДНК коррелирует с содержанием в ее молекуле ГЦ-пар.

Оборудование, реактивы. Спектрофотометр с термостатированной камерой; стандартный солевой раствор, содержащий хлорид натрия (0,15 моль) и цитрат натрия (0,015 моль) в 1 *л* (pH 7,0); препарат ДНК.

Препарат ДНК растворяют (из расчета 10 — 20 мкг ДНК в 1 мл) стандартном солевом растворе, разбавленном в 10 раз. Раствор помещают в кварцевую кювету (1 см) с герметической крышкой для предотвращения испарения. На спектрофотометре определяют

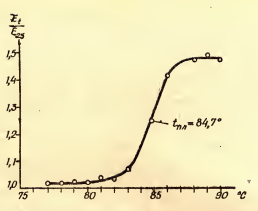


Рис. 39. Кривая плавления ДНК, выделенной из микроорганизма Proteus vulgaris (по Манделю и Мармуру).

экстинкции (E_{260} нм) при разных температурах в промежутке от 25 до 95°С с интервалом не более 5°С и выдержкой при определенной температуре в течение 5—10 мин. Если наблюдается резкое изменение экстинкции при какой-либо температуре, это указывает на то, что исследуемая ДНК нативна; если рост экстинкции происходит постепенно, то ДНК частично денатурирована.

По результатам измерений строят кривую «плавления». Для этого по оси ординат откладывают отношения оптической плотности раствора при измеряемой температуре (t) к оптической плотности при 25°С, а по оси абсцисс — температуру. Точку плавления ($t_{пл}$) ДНК находят по кривой плавления. Она соответствует середине зоны подъема кривой относительной экстинкции (рис. 39).

Зависимость между точкой плавления и содержанием ГЦ-пар в ДНК определяют по формуле:

$$C_{гц} = (t_{пл} - 69{,}3) \cdot 2{,}44,$$

где $C_{гц}$ — содержание ГЦ-пар в молярных процентах, а 69,3 и 2,44 — постоянные коэффициенты.

Средние данные получают из 3—4 параллельных опытов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТЫ СЕДИМЕНТАЦИИ (ИЛИ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ) РНК МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Наиболее распространенными методами определения относительной молекулярной массы нуклеиновых кислот являются вискозиметрические и седиментационные методы, а также электронная микроскопия. Однако в результате широкого применения в последнее время электрофореза в полиакриламидном геле для фракцио-

нирования белков и нуклеиновых кислот выяснено, что электрофоретическая подвижность биополимеров пропорциональна константе седиментации, а следовательно, и относительной молекулярной массе. Если в исследуемом образце имеется компонент с известной относительной молекулярной массой или константой седиментации, то можно рассчитать указанные величины для других компонентов. В качестве образцов РНК с известной константой седиментации используют рибосомальные РНК, выделенные из кишечной палочки E. coli (соответственно 23*S* и 16*S*) или из печени крысы (соответственно 28*S* и 18*S*).

Оборудование, реактивы. Оборудование и реактивы, необходимые для фракционирования РНК методом электрофореза в полиакриламидном геле (с. 166); препараты РНК из грены тутового шелкопряда и печени крысы, выделенные по методу Шеррера.

На три колонки с полиакриламидным гелем наносят по 0,01—0,05 мл раствора, содержащего 30—60 мкг РНК, выделенной из грены тутового шелкопряда, на три другие — столько же РНК из печени крысы. Колонки помещают в общий электрофоретический блок и проводят электрофорез. Условия проведения электрофореза и обработки колонок с полиакриламидным гелем аналогичны тем, что указаны на странице 166.

После выявления соответствующих фракций РНК определяют относительную электрофоретическую подвижность каждой фракции по отношению к метчику — бромфеноловому синему. На основании полученных данных строят график зависимости электрофоретической подвижности от константы седиментации для фракций РНК печени крысы. По оси ординат откладывают величины констант седиментации (28*S* и 18*S*) или значения относительной молекулярной массы фракций РНК, по оси абсцисс — их относительную электрофоретическую подвижность. По величине относительной электрофоретической подвижности высокомолекулярных фракций РНК грены тутового шелкопряда определяют константы седиментации этих фракций или значения относительной молекулярной массы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДНОГО СОСТАВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Гидролиз ДНК и разделение оснований с помощью хроматографии на бумаге

В выделенных из тканей животных или других объектов ДНК всегда имеется небольшая примесь РНК. Для последующего определения оснований, присутствующих в молекуле ДНК, необходимо удалить РНК. Этого проще всего достигнуть с помощью щелочного гидролиза в определенных условиях, при которых РНК расщепляется до нуклеотидов, а ДНК остается неизменной и ее можно путем осаждения отделить от растворимых рибонуклеотидов.

Оборудование, реактивы. Центрифуга рефрижераторная; спектрофотометр; ультрахемиоскоп Брумберга; термостат; баня водяная; камера хроматографическая; пробирки стеклянные центрифужные; бумага хроматографическая (медленная); карандаши графитовые; чашка фарфоровая выпарительная (на 50 мл); пробирки стеклянные химические; препарат ДНК; гидроксид натрия (0,75 н.); бумага лакмусовая; хлорная кислота (1,5%-ная; 57%-ная и 72%-ная); этанол (96%-ный); диэтиловый эфир; соляная кислота (0,1 н. и 1 н.); кислый проявитель Кирби — смесь абсолютного метанола, концентрированной соляной кислоты и воды (70 : 20 : 10); аденин, гуанин, цитозин и тимин (по 50 мкг каждого в 1 мл) в соляной кислоте (0,1 н.).

Щелочной гидролиз ДНК. ДНК в количестве 200—300 мг в центрифужной пробирке с подобранной к ней пробкой с проходящей через последнюю стеклянную палочкой заливают 0,75 н. раствором гидроксида натрия из расчета 1 мл раствора на каждые 100 мг вещества. Смесь тщательно размешивают стеклянной палочкой, после чего пробирку прикрывают пробкой (сначала неплотно) и ставят в термостат при 37°С на 18 ч. Через 15—20 мин, когда воздух в пробирке прогреется, пробку закрывают полностью. В течение гидролиза повторно размешивают осадок до полного его растворения.

По окончании гидролиза пробирку со смесью охлаждают до 0°С, смесь нейтрализуют по лакмусу концентрированной хлорной кислотой (57%-ный раствор), добавляя ее по каплям (учесть количество добавленных капель). К нейтрализованной смеси, объем которой рассчитывают, суммируя объем взятой щелочи и объем добавленной кислоты, прибавляют избыток концентрированной хлорной кислоты до ее конечной концентрации в 1—2%. Необходимое для этого количество кислоты прибавляют по каплям при хорошем размешивании и охлаждении. ДНК в этот момент выпадает в осадок. После этого палочку вынимают, обмывают ее кончик 2—3 каплями 1,5%-ного раствора хлорной кислоты и смесь центрифугируют 10—20 мин (при 6000 *g* и 0°С). Надосадочную жидкость, в которой содержатся рибонуклеотиды, выливают. Осадок дважды промывают с размешиванием охлажденным 1,5%-ным раствором хлорной кислоты с последующим центрифугированием. Вслед за этим хлорную кислоту удаляют двукратным промыванием осадка охлажденным 96%-ным спиртом и, наконец, эфиром (для удаления спирта). Эфир удаляют на слегка нагретой водяной бане. Осадок высушивают в сушильном шкафу при 100—105°С в течение 30 мин. Всю обработку ДНК после нейтрализации щелочного гидролизата хлорной кислотой производят обязательно при охлаждении до 0—3°С и быстро, 1—1,5 ч.

Кислотный гидролиз ДНК и разделение оснований. Сухой остаток делят на две части, переносят в две стеклянные ампулы, смачивают его 1—2 каплями 72%-ного раствора хлорной кислоты так, чтобы осадок ДНК ею полностью пропитался, после чего ампулы запаивают и нагревают в кипящей водяной бане в течение 1 ч. В этих условиях ДНК полностью гидролизуется до оснований. Не рекомендуется брать большой

избыток хлорной кислоты из-за значительного разрушения тимина. По окончании гидролиза охлажденные ампулы осторожно вскрывают, гидролизат разбавляют 2—3 каплями дистиллированной воды и тщательно перемешивают, обмывая стенки ампулы. Основания, полученные в результате гидролиза, разделяют с помощью нисходящей хроматографии на бумаге (с. 9). Пользуются медленной хроматографической бумагой, которую предварительно промывают растворителем Кирби в хроматографической камере в течение 2—3 суток, после чего промывают дистиллированной водой либо в камере, либо в ванночке и высушивают. На лист бумаги шириной 30 см и длиной 58 см наносят специальными микропипетками (с. 9) три порции гидролизата по 0,02 г полосами длиной 4 см и шириной 0,5 мм с промежутками в 1,5 см между ними. Четвертую такую же полосу оставляют для контроля, а на пятую наносят раствор свидетелей, содержащий по 50 мкг каждого основания в 1 мл. Проявление хроматограммы ведут в течение 12—15 ч. Основания располагаются на ней в следующем порядке: гуанин, аденин, цитозин и тимин.

Элюция и спектрофотометрия. Полосы оснований обнаруживают с помощью ультрахемископа Брумберга по их поглощению в ультрафиолете. Полосы очерчивают графитовым карандашом и вырезают вместе с соответствующими по размерам и местоположению участками с контрольной полосы бумаги, помещают в пробирки и элюируют (5 мл) 0,1 н. раствором соляной кислоты в течение 12 ч при 37°С.

Элюаты сливают в кварцевые кюветы (ширина 1 см) и спектрофотометрируют на СФ-4 против элюатов с контрольных участков бумаги при следующих длинах волн: гуанин — 250 и 290 нм; аденин — 260 и 290 нм; цитозин — 276 и 290 нм; тимин — 260 и 290 нм.

Для вычисления содержания оснований в гидролизате ДНК пользуются расчетными коэффициентами. Количество микромолей, рассчитанное для всех оснований, суммируют. Сумму принимают за 100% и вычисляют процентное содержание каждого основания в ДНК в молярных процентах, значения которых заносят в таблицу, и выводят среднее из трех параллельных определений.

Основание	Содержание оснований (в мкмолях на 5 мл элюата)	Молярные проценты			
		первая полоса	вторая полоса	третья полоса	среднее
Гуанин	0,714 $(E_{250}-E_{290})$ =				
Аденин	0,399 $(E_{260}-E_{290})$ =				
Цитозин	0,940 $(E_{276}-E_{290})$ =				
5-метилцитозин	0,893 $(E_{280}-E_{300})$ =				
Тимин	0,743 $(E_{260}-E_{290})$ =				

Определение нуклеотидного состава ДНК с помощью тонкослойной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе

Основными достоинствами этого метода являются быстрота разделения анализируемых веществ, четкость их локализации и высокая чувствительность (с. 14). Указанный метод позволяет использовать как высоко очищенные препараты ДНК, так и частично депротеинизированные.

Оборудование, реактивы. Спектрофотометр; ультрахемископ Брумберга; термостат; пробирки стеклянные химические; колба коническая на 100 мл; воронка Бюхнера; индикатор универсальный; микропипетки; пластинки стеклянные (24×5 см); пипетки градуированные на 10 мл; камера стеклянная (высота 25 см); воронка стеклянная (3 шт.); соляная кислота (0,1 н., 1,0 н. и 2,0 н.); гидролизат ДНК (с. 173); кислый проявитель Кирби — смесь абсолютного метанола, соляной кислоты (конц.) и воды (70 : 20 : 10); ДЭАЭ (диэтиламиноэтил)-целлюлоза.

Приготовление суспензии ДЭАЭ-целлюлозы и нанесение ее на стеклянную пластинку. ДЭАЭ-целлюлозу предварительно промывают растворителем Кирби, используемым для хроматографии. С этой целью 10 г ДЭАЭ-целлюлозы встряхивают с 50 мл кислого растворителя Кирби в течение 30 мин, отделяют от него фильтрованием, используя воронку Бюхнера. Промывают многократно дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод, затем 2 н. раствором соляной кислоты и снова водой до pH 7,0. Целлюлозу подсушивают при комнатной температуре, а затем в сушильном шкафу при 100°С в течение 30 мин.

Хроматографию гидролизатов ДНК проводят на стеклянных пластинках (24×5 см), покрытых слоем ДЭАЭ-целлюлозы. Для нанесения слоя готовят суспензию ДЭАЭ - целлюлозы в воде из расчета: 1 г промытой целлюлозы на 9 мл воды. На стеклянные пластины, установленные строго горизонтально, выливают по 18 мл суспензии, слой разравнивают и пластины оставляют на 8—10 ч при комнатной температуре для высыхания. Перед нанесением гидролизата ДНК пластины подсушивают в сушильном шкафу при температуре 100°С в течение 10—20 мин.

Хроматография оснований ДНК. Карандашом на слое ДЭАЭ-целлюлозы слабо намечают линию нанесения образца в виде короткой поперечной полосы длиной 1,5 см, на расстоянии 2 см от нижнего края и 0,5 см от одной из боковых сторон. Свободная половина пластины служит контролем. На каждую пластину с помощью микропипетки наносят такое количество гидролизата, которое соответствует 0,6 мг исходной ДНК. Разделение оснований осуществляют с помощью одномерной восходящей хроматографии в стеклянных камерах высотой 25 см. На дно камер наливают слой проявителя высотой 1 см. Разделение оснований ДНК в кислом проявителе Кирби при комнатной температуре за-

нимает 2 ч. При этом фронт проявителя достигает верхнего края пластины, в результате чего удается разделить при данных условиях 4 обычных основания ДНК и одно дополнительное, а именно 5-метилцитозин, содержащихся в ДНК. По окончании разделения пластины вынимают, высушивают в токе теплого воздуха, просматривают в ультрахемископе и отмечают местоположение отдельных пятен.

Расположение оснований на хроматограмме следующее (от линии старта): гуанин, аденин, цитозин, 5-метилцитозин, тимин.

Элюция и спектрофотометрирование. Участки целлюлозы, содержащие основания, и соответствующие контрольные участки хроматограмм аккуратно соскабливают с пластин и помещают в пробирки с притертыми пробками. Элюцию оснований с целлюлозы осуществляют 5 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты. Для элюции гуанина используют 1 н. раствор соляной кислоты. После 18 ч инкубации при температуре 37°С элюаты отделяют от целлюлозы фильтрованием через бумажные фильтры. Спектрофотометрирование и расчет процентного соотношения оснований осуществляют методом, изложенным в предыдущей работе.

Гидролиз РНК и электрофоретическое разделение нуклеотидов на бумаге

Гидролиз РНК обычно проводят с целью качественного и количественного определения входящих в состав РНК компонентов. В зависимости от взятого для гидролиза реагента глубина гидролиза РНК различна. При кипячении с минеральными кислотами (серной, хлорной) или с некоторыми органическими кислотами (трихлоруксусной кислотой) нуклеиновые кислоты разлагаются до гетероциклических оснований, углевода и фосфорной кислоты. РНК гидролизуется 1 н. раствором щелочи до нуклеотидов. Присутствующая как примесь ДНК не подвергается щелочному гидролизу и при дальнейшей обработке кислотой осаждается, а рибонуклеотиды остаются в растворе.

Оборудование, реактивы. Спектрофотометр; ультрахемископ Брумберга; центрифуга рефрижераторная; прибор для электрофореза на бумаге; эксикатор с краном, содержащий гидроксид калия; термостат; пробирки стеклянные центрифужные; пипетка градуированная на 1 мл; бумага для электрофореза; карандаш графитовый 2М-4М; стаканчики высокие для взвешивания; препарат РНК; гидроксид калия (0,75 н., 40%-ный); бумага лакмусовая; хлорная кислота (1,5%-ная, 72%-ная); бумага индикаторная с бромтимоловым синим; уксусная кислота (2 н.); ледяная уксусная кислота; аммиак (25%-ный); фосфатный буфер (0,3—0,5М), pH 7,0; ацетатно-аммонийный буфер (2 М), pH 3,5.

Щелочной гидролиз РНК. 200—300 мг РНК помещают в центрифужную пробирку и заливают ее 0,75 н. раствором гидроксида калия из расчета 1 мл раствора на 100 мг РНК. Далее работу ведут по прописи, приведенной на странице 172, вплоть до получения надосадочной жидкости, содержащей рибонуклеотиды.

Ее сливают с осадка в центрифужную пробирку. В осадке находится ДНК (если ее примесь была в исходной РНК), а также перхлорат калия, образовавшийся при нейтрализации щелочи. Если осадок значителен, его следует промыть охлажденной 1,5%-ной хлорной кислотой; последней добавляют 0,5 мл, перемешивают и центрифугируют. Промывную жидкость присоединяют к основному раствору рибомононуклеотидов и нейтрализуют кислый раствор 40%-ным раствором гидроксида калия по бромтимоловой синей индикаторной бумаге (изменение цвета от желтого к синему в интервале pH 6,0—7,6). Раствор оставляют при 0°С на 1—3 ч для лучшей кристаллизации малорастворимого перхлората калия. Смесь центрифугируют, раствор мононуклеотидов сливают в стаканчик для взвешивания, осадок промывают двумя порциями по 0,5 мл ледяной дистиллированной воды. Промывные воды присоединяют к основному раствору рибомононуклеотидов. Раствор концентрируют до объема приблизительно 2—3 мл в эксикаторе с краном над гидроксидом калия, следя за тем, чтобы pH раствора оставался нейтральным. Раствор можно лиофилизировать и твердый остаток растворить в 3—4 мл воды.

Электрофоретическое разделение рибомононуклеотидов на бумаге. Бумагу для электрофореза (быстровпитывающую для хроматографии) предварительно промывают 2 н. раствором уксусной кислоты, а затем дистиллированной водой до нейтральной реакции. Бумагу разрезают на полосы (4 × 40 см), на расстоянии 8 см от катодного конца наносят мягким графитным карандашом две поперечные линии с промежутком 2—3 мм между ними. В камеру для электрофореза ставят 3 полосы бумаги. Одна из них — контрольная. Бумагу смачивают 0,05—0,07 М ацетатно-аммонийным буфером с pH 3,5 (смешивают 2,11 моль уксусной кислоты с 0,11 моль аммиака и полученную смесь разбавляют водой до 1 л; образуется смесь из 2 моль уксусной кислоты и 0,11 моль ацетата аммония. Ее перед употреблением разбавляют до концентрации 0,05—0,07 М, т. е. примерно в 35 раз). На влажную от буферного раствора бумагу между двумя намеченными ранее поперечными линиями наносят раствор рибомононуклеотидов в количестве 0,1—0,4 мл без подсушивания в один прием. Это удобно делать покровным стеклом (с. 48). Разделение нуклеотидов происходит в течение 5 ч при градиенте напряжения 15—18 в/см. Порядок расположения нуклеотидов от катода к аноду таков: цитидиловая, адениловая, гуаниловая и уридиловая кислоты. Полосы нуклеотидов темного цвета обнаруживают с помощью ультрахемископа Брумберга по их поглощению в ультрафиолете. Их очерчивают графитным карандашом. Иногда цитидиловая кислота мало сдвигается от линии нанесения, что создает трудности при ее определении. В этом случае ставят электрофорез на другой полосе бумаги длительностью до 14 ч. В результате чего цитидиловая и адениловая кислоты значительно удаляются от линии старта.

Количественное определение нуклеотидов. Очерченные карандашом участки бумаги вырезают вместе с соответствующими им по размерам и местоположению участками с контрольной полосы бумаги, разрезают на мелкие кусочки, помещают в пробирки и элюируют нуклеотиды 5 мл фосфатного буфера (0,3—0,5 М; pH 7,0) в течение 12 ч, закрыв пробирки пробками и изредка перемешивая их содержимое. Элюаты, освобожденные от волокон бумаги фильтрованием через ватный тампон под вакуумом, спектрофотометрируют против элюатов с контрольных участков бумаги; спектрофотометрирование ведут в кварцевых кюветах шириной 1 см при следующих длинах волн: гуаниловая кислота — 255 и 290 нм; адениловая — 260 и 290 нм; цитидиловая — 270 и 290 нм и уридиловая — 260 и 290 нм.

Для вычисления количества нуклеотидов пользуются следующими расчетными коэффициентами:

Нуклеотнды	Содержание нуклеотндов (в мкмолях на 5 мл элюата)	Молярные проценты
Гуаниловая кислота	0,470 $(E_{255}—E_{290})$ =	
Адениловая кислота	0,363 $(E_{260}—E_{290})$ =	
Цитидиловая кислота	0,730 $(E_{270}—E_{290})$ =	
Уридиловая кислота	0,515 $(E_{280}—E_{290})$ =	

Число микромолей, рассчитанное для всех нуклеотидов, суммируют, сумму принимают за 100% и вычисляют процентное содержание каждого нуклеотида в молярных процентах. Полученные данные заносят в приведенную таблицу.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Для определения содержания нуклеиновых кислот в тканях существует много способов. Все они основаны либо на использовании специфических реакций на рибозу, дезоксирибозу и фосфорную кислоту, либо на измерении специфического поглощения нуклеиновыми кислотами ультрафиолетовых лучей за счет содержащихся в их составе азотистых оснований. Непосредственному определению нуклеиновых кислот предшествуют подготовительные операции. Это, во-первых, удаление веществ, мешающих определению нуклеиновых кислот. В зависимости от способа измерения содержания нуклеиновых кислот такими веществами могут быть углеводы, фосфорсодержащие соединения, свободные нуклеотиды, нуклеозиды, гетероциклические основания, аминокислоты, пептиды и т. д. Для удаления этих веществ материал тщательно измельчают в условиях, обеспечивающих ингибирование нуклеаз

(с.158). Затем из него последовательно извлекают кислоторастворимую фракцию фосфорсодержащих соединений обработкой разбавленными растворами хлорной и трихлоруксусной кислот и липидную фракцию — органическими растворителями в определенной последовательности. Подготовительные операции включают, во-вторых, разделение нуклеиновых кислот на РНК и ДНК. Чаще всего для этой цели используют метод Шмидта — Таннгаузера (с. 181).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ПО ФОСФОРУ

Определение нуклеиновых кислот по содержанию фосфора можно проводить в свежем или фиксированном биологическом материале. Лучший способ фиксации — лиофилизация. Хорошие результаты дает фиксация горячим 96%-ным этанолом (1 : 15). В последнем случае после отгонки этилового спирта от образца материал измельчают в жидком азоте и в таком виде ткань используют для анализа.

Оборудование, реактивы. Центрифуга рефрижераторная; фотоэлектроколориметр; баня водяная; баня песочная; эксикатор с краном; пробирки стеклянные химические; колбы с градуированной горловиной на 10 и 25 мл; пипетки градуированные на 1, 2, 5 и 10 мл; холодильник стеклянный лабораторный с прямой трубкой; шпатель (длина 150 мм); трихлоруксусная кислота (1%-ная и 7%-ная); хлорная кислота (0,5 н.); серная кислота (10 н.); гидроксид калия и гидроксид натрия (5 н.) свежеприготовленные; этанол (96%-ный); смесь этанола с эфиром (1 : 1); метанол; хлороформ; диэтиловый эфир; пергидроль; фенолфталеин; молибдат аммония (2,5%-ный) в 5 н. серной кислоте (см. приложение); раствор эйконогена (см. приложение), разбавленный перед употреблением в 5 раз водой; стандартный раствор фосфата (см. приложение).

Отделение фосфора кислоторастворимой фракции. Фосфорные соединения кислоторастворимой фракции представлены фосфорными эфирами сахаров, глицерофосфатами, свободными нуклеотидами, неорганическими фосфатами. 0,1—0,3 г сухого материала помещают в центрифужную пробирку на 40—50 мл. Материал суспендируют в 10—20 мл 7%-ного раствора трихлоруксусной кислоты на холоду в течение 20 мин. Затем центрифугируют при 3000 g в течение 10 мин. Центрифугат отбрасывают, осадок 2—3 раза промывают порциями по 30—35 мл охлажденного 1%-ного раствора трихлоруксусной кислоты.

Извлечение фосфолипидов. Остаток в центрифужной пробирке после извлечения фосфора кислоторастворимой фракции последовательно обрабатывают сначала 10—20 мл 96%-ного этанола в течение 5—6 мин при комнатной температуре, а затем 10—15 мл смеси этанола и эфира (1 : 1) на кипящей водяной бане в течение 10 мин с использованием обратного холодильника. Центрифугируют и осадок обрабатывают 10 мл метанола в течение 5—6 мин. Добавляют 10 мл хлороформа и кипятят с обратным

холодильником на водяной бане в течение 30 мин. В заключение осадок обрабатывают 10—20 мл эфира. Осадок после обработки эфиром высушивают в центрифужной пробирке в эксикаторе с краном и используют для определения нуклеиновых кислот.

Выделение суммарной фракции нуклеиновых кислот. К высушенному осадку в центрифужной пробирке приливают 10—20 мл 0,5 н. раствора хлорной кислоты и экстрагируют при 70°С в течение 20 мин. Экстракцию повторяют еще 2 раза в тех же условиях, но с меньшим объемом кислоты (5—10 мл). Все три экстракта сливают вместе, нейтрализуют 5 н. раствором гидроксида калия и оставляют на холоду на 10—12 ч. Выпадает осадок перхлората калия, который отделяют центрифугированием. Осадок дважды промывают 1—2 мл охлажденной дистиллированной воды. Надосадочные жидкости объединяют и доводят водой до 25—50 мл. Объединенные экстракты служат для определения суммарного количества нуклеиновых кислот по фосфору после минерализации определенной части экстракта.

Определение фосфора. Фосфор определяют колориметрическим методом Фиске—Суббароу. Сущность его заключается в том, что ортофосфорная кислота образует с молибденовой кислотой комплексное соединение, которое легко восстанавливается различными восстановителями с образованием окрашенной в синий цвет молибденовой сини. В методе Фиске-Суббароу в качестве восстановителя применяется 1-амино-2-нафтол-4-сульфоновая кислота (эйконоген). Образовавшийся раствор синего цвета той или иной интенсивности сравнивают со стандартным раствором соли фосфорной кислоты, который подвергают той же процедуре. Для определения фосфора нуклеиновых кислот необходимо его перевести в ортофосфорную кислоту, что достигается нагреванием с серной кислотой — минерализацией. Для определения фосфора нуклеиновых кислот берут 5—10 мл гидролизата нуклеиновых кислот, помещают его в тугоплавкую пробирку и прибавляют 1,5 мл 10 н. серной кислоты. Одновременно ставят контрольную пробу (без гидролизата). Пробирки помещают в песочную баню так, чтобы вся нижняя часть их, где находится смесь, была погружена в песок, и нагревают до 150—160°С в течение 30—40 мин, пока не испарится вся вода. Смесь в опытной пробирке принимает бурую окраску. Ее слегка охлаждают (пробирку ставят в штатив), приливают 2—3 капли пергидроля так, чтобы капли попадали в жидкость, и пробирку снова нагревают около 10—15 мин. Такую же операцию проделывают с контрольной пробой. Если жидкость остается окрашенной, добавляют еще 2 капли пергидроля и снова нагревают. Так продолжают поступать с опытной и контрольной пробами до тех пор, пока жидкость в первой не станет бесцветной. После этого добавляют 3—4 мл воды и нагревают на кипящей водяной бане 15—20 мин для разрушения пирофосфатов. Для нейтрализации кислоты к пробам добавляют по 1—2 капли фенолфталеина и осторожно по каплям примерно по 3 мл 5 н. раствора

гидроксида натрия до появления бледно-красной окраски растворов. Нейтрализованные растворы количественно переносят в мерные колбы на 10 мл, промывают несколько раз пробирки небольшими порциями дистиллированной воды, которую сливают в те же мерные колбы, и воду доливают до метки.

В две мерные колбы на 10 мл берут пипеткой по 2 мл нейтрализованного раствора и в третью колбу 2 мл контрольного раствора. В каждую колбу вносят при помешивании по 1,2 мл раствора молибдата аммония, затем 1 мл разбавленного в 5 раз раствора эйконогена. Раствор доливают до метки водой и тщательно перемешивают. Синяя окраска развивается быстро при комнатной температуре. Колориметрируют через 20 мин в фотоэлектроколориметре против контрольной пробы при красном светофильтре. Одновременно с исследуемыми растворами готовят окрашенные стандартные растворы фосфата, беря пипеткой в мерные колбы на 10 мл 1 мл и 2 мл стандартного раствора фосфата, по 1,2 мл раствора молибдата аммония и 1 мл раствора эйконогена. Следует пользоваться тем из приготовленных растворов, окраска которого наиболее близка к окраске исследуемых растворов.

Рассчитывают содержание фосфора нуклеиновых кислот (в мг %) по формуле:

$$C = \frac{a \cdot E_1 \cdot V \cdot 100 \cdot V_3}{E \cdot V_1 \cdot b \cdot V_2},$$

где C — содержание фосфора нуклеиновых кислот; a — число миллиграммов фосфора в 10 мл стандартного раствора; E и E_1 — оптическая плотность (экстинкция) стандартного и исследуемого растворов; V — весь объем исследуемого раствора (10 мл); V_1 — объем исследуемого раствора, взятый для определения фосфора (в данном случае 2 мл); b — масса исследуемого материала (в г); V_2 — объем раствора, взятого для минерализации (в мл); V_3 — общий объем гидролизата нуклеиновых кислот (в мл).

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК РЕАКЦИЕЙ С ДИФЕНИЛАМИНОМ ПО ДИШЕ

Для определения нуклеиновых кислот используют цветные реакции на рибозу и дезоксирибозу. Самой распространенной цветной реакцией на ДНК является реакция с дифениламином.

Оборудование, реактивы. Спектрофотометр; фотоэлектроколориметр; баня водяная; пробирки стеклянные химические; трубки стеклянные; пипетки градуированные на 1, 2 и 5 мл; препарат ДНК; трихлоруксусная кислота (5%-ная); дифениламин (см. приложение); хлорная кислота 0,5 н; гидроксид натрия (0,01 н.).

3 мг ДНК помещают в пробирку с обратным холодильником, приливают 5 мл 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и нагревают в течение 15 мин при 90°C. Полученный гидролизат фильтруют. Если фильтрат мутный, фильтруют для полной про-

зрачности через сухой асбест, помещенный в воронку со стеклянной пористой пластинкой. Из фильтрата берут пипеткой 1 мл раствора и прибавляют двойной объем раствора дифениламина. Смесь нагревают на кипящей водяной бане 10 мин. Жидкость окрашивается в синий цвет. После охлаждения раствор фотометрируют на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром в кювете (0,5 см). Содержание ДНК определяют по стандартной кривой.

Стандартную кривую строят после проведения приведенной выше цветной реакции с гидролизатами ДНК известной концентрации. 90—100 мг ДНК растворяют в 50 мл 0,01 н. раствора гидроксида натрия. Концентрацию ДНК определяют спектрофотометрически, для чего 1,0 мл исходного раствора гидролизуют в 20 мл 0,5 н. раствора хлорной кислоты в течение 30 мин на кипящей водяной бане, и определяют оптическую плотность гидролизата при 270 и 290 нм.

$$C_{\text{ДНК(мкг/мл)}} = \frac{[E_{270} - E_{290}] \cdot 10,1}{0,19}.$$

Для определения концентрации ДНК в 1 мл исходного раствора полученное значение концентрации необходимо умножить на величину разведения, т. е. в данном случае на 20. Из исходного раствора готовят 3 серии растворов ДНК с концентрациями 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 мкг/мл.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК И РНК В ГРЕНЕ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

Содержание нуклеиновых кислот в грене тутового шелкопряда определяют методом Шмидта — Таннгаузера с использованием двухволновой спектрофотометрии.

Оборудование, реактивы. Центрифуга рефрижераторная; спектрофотометр; термостат; баня водяная; эксикатор с краном; стакан стеклянный лабораторный высокий без носика; воронка Бюхнера; ступка фарфоровая (диаметр 90 мм); азот жидкий; гидроксид натрия (2%-ный); додецилсульфат натрия (0,2%-ный); хлорная кислота (0,2, 0,3, 0,5, 1,2 н.); гидроксид калия (0,5 н.); этанол (96%-ный); ацетат калия (2%-ный) в этаноле (50%-ном); смесь ацетона с хлороформом (5 : 1); смесь хлороформа с метанолом (1 : 1); диэтиловый эфир; гидроксид калия; лед.

Экстракция кислоторастворимых соединений. 0,5 г грены, подготовленной к анализу в соответствии с прописью, приведенной на странице 164, помещают в фарфоровую ступку и измельчают при охлаждении жидким азотом в тонкий порошок. Кислоторастворимые соединения экстрагируют десятикратным объемом 0,3 н. раствора хлорной кислоты в течение 20 мин при 0°С. Полученный гомогенат центрифугируют при 5000 *g* в течение 20 мин при 0°С. К осадку в центрифужной пробирке приливают 1,5 мл охлажденной 0,2 н. хлорной кислоты, перемешивают при охлаждении в течение 20 мин и вновь центрифугируют

при тех же условиях. Для контроля полноты экстракции кислоторастворимых соединений измеряют поглощение последнего кислого экстракта на спектрофотометре при 260 нм против раствора хлорной кислоты. Экстинкция его не должна превышать 0,10. Обычно экстракцию 0,2 н. раствором хлорной кислоты проводят трижды.

Удаление хлорной кислоты. Осадок, содержащий белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и липиды, обрабатывают сначала 5 мл 50%-ного раствора этанола, содержащего 2% ацетата калия, а затем 5 мл 96%-ного этанола при температуре 0—4°С в течение 15—20 мин, отделяя его каждый раз центрифугированием.

Экстракция липидных соединений. Липиды экстрагируют сначала смесью ацетона с хлороформом (5 : 1) трижды на холоду, затем кипящей смесью хлороформа с метанолом (1 : 1) тоже 3 раза и в заключение — однократно диэтиловым эфиром. Каждый раз экстракцию липидов проводят 10 мл растворителя в течение 20 мин, отделяя растворитель от осадка центрифугированием при 5000 g в течение 15—20 мин. Осадок после обработки эфиром высушивают в эксикаторе с краном над твердым гидроксидом калия.

Определение содержания нуклеиновых кислот. Из подготовленного таким образом материала нуклеиновые кислоты извлекают 0,5 н. раствором гидроксида калия в течение 18 ч при 37°С (на 10 мг сухого вещества грены берут 1 мл 0,5 н. раствора гидроксида калия). Смесь охлаждают до 0°С и центрифугируют при охлаждении. Осадок дважды промывают 3 мл 0,5 н. охлажденного раствора гидроксида калия и центрифугируют. Щелочные супернатанты объединяют, а осадок отбрасывают. К объединенным щелочным центрифугатам осторожно, по каплям, при постоянном помешивании добавляют рассчитанное количество 1,2 н. раствора хлорной кислоты до 0,2 н. конечной концентрации (рН 1,0). При этом выпадает в осадок ДНК, белок и перхлорат калия, а в растворе остаются продукты щелочного гидролиза РНК. Для полноты осаждения ДНК, белка и перхлората калия раствор выдерживают 10 мин при 0°С, центрифугируют и дважды промывают осадок 2 мл 0,2 н. раствора хлорной кислоты. Центрифугаты, содержащие весь гидролизат РНК, объединяют и измеряют. Из этого раствора берут 5 мл, нагревают в течение 20 мин на кипящей водяной бане и измеряют оптическую плотность при 260, 270 и 290 нм на спектрофотометре.

Осадок, содержащий ДНК, заливают 20 мл 0,5 н. раствора хлорной кислоты и гидролизуют на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Оптическую плотность гидролизата измеряют при 260, 270 и 290 нм.

Контролем чистоты растворов нуклеиновых кислот служит определение УФ-поглощения их при 260 нм и 270 нм (экстинкция при 260 нм не должна отличаться более чем на 15% от таковой при 270 нм.).

По данным 5 измерений вычисляют среднюю разность. Концентрацию нуклеиновых кислот определяют по формуле:

$$C = \frac{(E_{270} - E_{290}) \cdot k \cdot V}{190 \cdot a},$$

где C — концентрация нуклеиновых кислот (в мг/г сырой массы); E — оптическая плотность растворов при соответствующей длине волны; 190 — удельная экстинкция, соответствующая 1 мг фосфора РНК в 1 мл раствора; k — коэффициент пересчета для перехода от содержания фосфора к содержанию нуклеиновых кислот (10,5 — для РНК; 10,1 — для ДНК); V — объем исследуемой пробы (в мл); a — масса грены (в г).

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ДНК И РНК В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ ПО МЕТОДУ НИМАНА И ПОУЛСОНА

Можно использовать свежий или фиксированный растительный материал. Фиксацию растительного материала осуществляют десятикратным объемом 96%-ного этанола, причем материал предварительно гомогенизируют со спиртом.

Оборудование, реактивы. Спектрофотометр; центрифуга; термостат; баня водяная; холодильник стеклянный лабораторный с прямой трубкой; пипетки градуированные на 1, 5 и 10 мл; колба мерная на 25 мл; пробирки стеклянные химические; этанол (96%-ный); 50%-ный этанол, подкисленный ледяной уксусной кислотой до pH 4,5; хлорная кислота (0,2 н, 0,5 н. и 15%-ная); гидроксид натрия (0,3 н.); смесь абсолютного этанола с эфиром 3 : 1; диэтиловый эфир; индикатор универсальный.

Подготовка материала к анализу. 1 г растительного материала очищают от пигментов и обезжиривают путем последовательной обработки каждый раз 10 мл 96%-ного этанола, 50%-ного этанола, подкисленного ледяной уксусной кислотой до pH 4,5 (2 раза), 0,2 н. хлорной кислотой (2 раза при охлаждении), 96%-ным этанолом (2 раза на холоду), смесью абсолютного этанола с эфиром (кипячение с обратным холодильником по 3 мин 2 раза) и эфиром (кипячение с обратным холодильником по 3 мин 2 раза) и эфиром при комнатной температуре (1 раз). Каждый раз осадок отделяют центрифугированием при 5000 g в течение 15—20 мин. Определяют выход обработанного указанными реактивами образца.

Экстракция нуклеиновых кислот. 200 мг подготовленного материала суспендируют в 5 мл 0,3 н. раствора гидроксида натрия и инкубируют при температуре 37°С в течение 18 ч. Осадок отделяют центрифугированием, промывают 5 мл 0,3 н. раствора гидроксида натрия и отбрасывают. Надосадочные промывные жидкости соединяют и доводят 0,3 н. раствором гидроксида натрия до 10 мл, подкисляют 15%-ной хлорной кислотой до pH 1,0, выдерживают 40 мин при —4°С и отделяют выпавший

осадок ДНК-протеида центрифугированием. Осадок ресуспендируют в 3 мл 0,2 н. раствора хлорной кислоты в течение 20 мин при температуре —4°С и снова отделяют центрифугированием. Надосадочные жидкости от двух последних центрифугирований объединяют и общий объем экстракта РНК доводят до 25 мл 0,2 н. раствором хлорной кислоты.

Осадок ДНК-протеида суспендируют в 3 мл 0,5 н. раствора хлорной кислоты, нагревают на водяной бане до 70°С в течение 15 мин, охлаждают и центрифугируют при охлаждении. Осадок белка промывают 2 мл охлажденного до 0°С 0,5 н. раствора хлорной кислоты и отделяют центрифугированием. Промывную жидкость соединяют с основным экстрактом от первого центрифугирования. Общий объем экстракта доводят до 5 мл 0,5 н. раствором хлорной кислоты. Содержание ДНК и РНК в экстрактах определяют спектрофотометрически, измеряя экстинкции при 270 и 290 нм. Содержание нуклеиновых кислот рассчитывают в соответствии со схемой, приведенной на странице 183.

ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Нуклеиновые кислоты вовлекаются в деструктивный обмен при участии разнообразных нуклеаз. Существует несколько методов выявления их активности. Чаще всего пользуются измерением экстинкции при 260 нм до и после ферментативного гидролиза нуклеиновых кислот, реже — измерением содержания фосфора или пентоз. Активность нуклеаз определяют также по изменению вязкости раствора ДНК в процессе гидролиза и по величине гиперхромного эффекта.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ РИБОНУКЛЕАЗЫ (КФ 2.7.7.16) СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Данный метод основан на том, что под действием рибонуклеазы происходит расщепление полимерной молекулы РНК с образованием низкомолекулярных продуктов (моно- и олигонуклеотидов), количественное определение которых проводят спектрофотометрически при 260 нм (максимум поглощения нуклеотидов) после осаждения из реакционной смеси «неразложенной» РНК с помощью спиртово-магниевого осадителя.

Оборудование, реактивы. Холодильник; центрифуга рефрижераторная марки ЦЛР-1; спектрофотометр марки СФ-16 либо СФ-4а; термостат; пипетка градуированная на 1 мл; пипетка с одной меткой на 1 мл; пробирки стеклянные химические (6 шт.); раствор предварительно очищенной дрожжевой РНК (1 мг/мл) в ацетате натрия (0,1М) (см. приложение) 0,2%-ный водный раствор панкреатической РНКазы (КФ 2.7.7.16); спиртово-магниевый осадитель (80%-ный этанол, содержащий 0,02М $MgCl_2$ в 1 л). Указанные реактивы готовят непосредственно перед работой.

В центрифужную пробирку вносят 0,4 мл раствора дрожжевой РНК и 0,2 мл водного раствора РНКазы, перемешивают и ставят в термостат при 37°C на 30—60 мин. По истечении указанного времени реакцию останавливают, добавляя к пробе 1 мл спиртово-магниевого осадителя, и пробирку помещают на 1 ч в ледяную баню. Образовавшийся в пробирке осадок РНК удаляют центрифугированием (8000*g*, 20 мин, при охлаждении). Из центрифугата отбирают пробы по 0,5 мл, прибавляют к каждой по 3 мл дистиллированной воды, перемешивают и измеряют оптическую плотность полученных растворов на спектрофотометре против дистиллированной воды.

Параллельно обрабатывают контрольную пробу, в которую осадитель вносят до прибавления ферментного раствора.

Прирост поглощения в опытной пробе по отношению к контрольной (ΔE_{260}) служит показателем активности РНКазы и используется для расчета активности фермента по формуле:

$$A = \frac{\Delta E_{260} \cdot V_1 \cdot V_2}{V_3 \cdot t \cdot W}, \text{ где}$$

ΔE_{260} — прирост экстинкции опытной пробы по отношению к контрольной;
t — время инкубации (в мин);
V_1 — объем пробы после разбавления;
V_2 — объем пробы после осаждения РНК спиртово-магниевым раствором;
V_3 — объем пробы, взятой для разбавления;
W — масса белка (фермента) в пробе (в мг).

Вместо раствора РНКазы можно использовать слюну, разбавленную в 10 раз, мочу, кровь животных и гемолимфу насекомых, разведенную в 100 раз, 5%-ные водные гомогенаты ткани объемом 0,5 мл.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗЫ ПО ОЛФРИ И МИРСКОМУ

Метод основан на обесцвечивании индикатора фенолового красного кислыми группами, образующимися из ДНК при действии на нее дезоксирибонуклеазы.

Оборудование, реактивы. Центрнфуга; фотоэлектроколориметр; ступка фарфоровая (диаметр 90 мм); пипетки градунроваииые иа 1,5 и 10 мл; хлорид натрия (0,14М); 0,01%-ный феноловый красиый (см. приложеине); субстратиый раствор для определення актнвиостн ДНКазы (см. приложение); буфер фосфатиый 1/15 М, pH 7,55 (85,7 мл 1/15М раствора гидрофосфата натрня смешивают с 14,3 мл 1/15 М раствора дигндрофосфата калия).

15 мг ткани (жировое тело личинки, куколки или грена тутового шелкопряда) быстро растирают в 10 мл охлажденного 0,14М раствора хлорида натрия и центрифугируют при 10 000 g в течение 14 мин. К 1 мл надосадочной жидкости, содержащей

ДНКазу, прибавляют 3 мл субстратного раствора. Смесь быстро переливают в кювету и делают замеры оптической плотности при 25°С на фотоэлектроколориметре при 558 нм (зеленый светофильтр) в течение 10—15 мин с интервалом в 1 мин. По результатам замеров строят график. По оси абсцисс откладывают время в минутах, по оси ординат — значения оптической плотности. Активность фермента выражают снижением оптической плотности комплекса ДНК и красителя, разрушающегося в результате гидролиза ДНК, за первые 3 мин отсчета.

КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ НУКЛЕОТИДОВ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ (ГРЕНЕ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА)

Определение свободных нуклеотидов в тканях животных, растений и у микроорганизмов складывается из следующих этапов: 1) экстракция нуклеотидов хлорной кислотой; 2) разделение смеси нуклеотидов на колонке с анионообменником Дауэкс-1; 3) идентификация выделенных нуклеотидов; 4) определение концентрации нуклеотидов.

Оборудование, реактивы. Центрифуга рефрижераторная; ультрахемископ Брумберга; спектрофотометр; мешалка магнитная; коллектор автоматический для сбора фракций; секундомер; аппарат для электрофореза; эксикатор с краном; бумага хроматографическая медленно впитывающая «Ватман 3ММ»; воронка фильтрующая; ступка фарфоровая (диаметр 90 мм); анионит Дауэкс 1×2 (200—400 меш.); катионит Дауэкс 50 (см. приложение); уголь активированный (см. приложение); хлорная кислота (0,2 н. и 0,3 н.); гидроксид калия (5 н.); соляная кислота (0,003, 0,01, 0,02, 0,1 н и 1,0 н.); ледяная уксусная кислота; гидроксид калия; хлорид натрия; аммиак (25%-ный); этанол (96%-ный); изомасляная кислота; растворы АМФ, АДФ, АТФ, ГМФ, ГДФ, УМФ, УДФ в водном изопропаноле (10%-ном) по 50 мкг в 1 мл.

Экстракция свободных нуклеотидов из грены тутового шелкопряда. 0,5 г грены помещают в ступку, измельчают при охлаждении жидким азотом в тонкий порошок и экстрагируют свободные нуклеотиды 5 мл 0,3 н. раствора хлорной кислоты в течение 20 мин при охлаждении. Полученный гомогенат центрифугируют при 5000 g в течение 20 мин при 0°С. К осадку в центрифужных пробирках приливают 2 мл холодной 0,2 н. хлорной кислоты, перемешивают при охлаждении в течение 20 мин и вновь центрифугируют при тех же условиях. Для контроля полноты экстракции нуклеотидов измеряют поглощение кислого экстракта на спектрофотометре при 260 нм против раствора хлорной кислоты. Обычно экстракцию 0,2 н. раствором хлорной кислоты проводят трижды. Экстракты объединяют, нейтрализуют 5 н. раствором гидроксида калия по универсальному индикатору, охлаждают; выпавший осадок перхлората калия отделяют центрифугированием.

Разделение нуклеотидных соединений с помощью ионообменной хроматографии.

Разделение нуклеотидов ведут на колонке (1×45 см), снабженной краном или капиллярным сифоном. На дно колонки помещают рыхлый тампон стеклянной ваты, предотвращающий попадание смолы в капилляр или ее вымывание. В колонку помещают смолу Дауэкс 1×2 (200—400 меш.) на высоту 35—38 см.

Сорбцию нуклеотидов из экстракта (pH 7,0—7,5) проводят путем пропускания раствора через колонку с анионитом со скоростью 0,7-1,0 мл/мин. После пропускания всего экстракта анионит тщательно промывают дистиллированной водой до исчезновения в промывных водах поглощения при 260 нм.

Нуклеотиды с ионообменной смолы элюируют в «выпуклом», экспоненциальном градиенте системой соляная кислота — соляная кислота и хлорид натрия. Такой градиент получают с помощью простого устройства, состоящего из двух сосудов: смесителя и резервуара (делительная воронка). В смеситель объемом 350 мл, заполненный 0,003 н. раствором соляной кислоты и установленный на магнитной мешалке, подают из резервуара раствор с более высокой концентрацией либо кислоты, либо кислоты и соли. Жидкость в колонку поступает из смесителя, убыль ее в последнем восполняется притоком из резервуара. Для разделения свободных нуклеотидов используют следующие системы, последовательно поступающие из резервуара: 1) 500 мл 0,01 н. раствора соляной кислоты; 2) 500 мл 0,02 н. раствора хлорида натрия в 0,01 н. растворе соляной кислоты; 3) 500 мл 0,1 н. раствора хлорида натрия в 0,01 н. растворе соляной кислоты; 4) 500 мл 1,0 н. раствора хлорида натрия в 0,01 н. растворе соляной кислоты.

Скорость тока элюента через колонку устанавливают 0,5 мл/мин. Элюат порциями по 5 мл собирают в отдельные пробирки при помощи коллектора фракций. Содержание нуклеотидов в элюате контролируют, измеряя экстинкцию каждой его порции на СФ-4 при 260 нм против воды. На основании этих измерений строят график элюции. Фракции, входящие в соответствующие пики, объединяют и высушивают в эксикаторе с краном над гидроксидом калия. Нуклеотиды из фракций, содержащих хлорид натрия, извлекают для качественного определения активированным углем, беря последний из расчета 1 мг угля на единицу экстинкции при 260 нм. Полноту сорбции контролируют спектрофотометрически при 260 нм. Сорбцию проводят при охлаждении при постоянном помешивании. Уголь после сорбции нуклеотидов тщательно промывают дистиллированной водой для удаления соли. Сорбированные углем нуклеотиды элюируют 0,5%-ным раствором аммиака в 50%-ном водном этаноле из расчета 10 мл элюента на 1 г угля. Элюцию нуклеотидов с угля проводят трижды по 30 мин, на холоду элюируется обычно не более 60—70% нуклеотидов. После каждой элюции уголь отделяют центрифугированием и надосадочную жидкость для освобождения от мельчайшей угольной пыли фильтруют через асбест, предва-

рительно промытый элюирующим раствором. Элюаты объединяют, высушивают в эксикаторе с краном над гидроксидом калия и используют для дальнейшего разделения методами хроматографии и электрофореза на бумаге. Для количественного определения нуклеотидных соединений во фракциях, содержащих хлорид натрия, используют обработку растворов смолой Дауэкс-50 в H^+форме.

Методы идентификации индивидуальных нуклеотидных соединений. Идентификацию выделенных из грены тутового шелкопряда нуклеотидов осуществляют на основании положения пика на кривой элюции с Дауэкс 1×2 и подвижности выделенных нуклеотидных соединений при хроматографии и электрофорезе на бумаге по сравнению с соответствующими свидетелями. Для хроматографического разделения нуклеотидов на бумаге используют: а) смесь 1 *М* ацетатно-аммонийного буфера (рН 3,8) с этанолом (30 : 75); б) смесь 1 *М* ацетатно-аммонийного буфера (рН 7,5) с этанолом (30 : 75) и в) изомасляную кислоту, насыщенную водой при 20°С и доведенную до рН 3,5—4,0 концентрированным аммиаком. Хроматографирование ведут на медленновпитывающей хроматографической бумаге Ленинградской фабрики № 2 им. Володарского, электрофорез — на бумаге «Ватман 3ММ» в 0,075 *М* ацетатно-аммонийном буфере (рН 3,5) при напряжении 15—18 в/см.

Результаты анализа оформляют в виде таблицы. В таблице указывают номера пиков, соответствующие им наименования нуклеотидов и все их качественные и количественные характеристики.

Расчет концентрации нуклеотидов. Расчет молярной концентрации нуклеотидов в анализируемых порциях элюата проводят переводом спектрофотометрических отсчетов в моли нуклеотида с учетом коэффициента молярной экстинкции по формуле:

$$C = \frac{E_{\lambda max} \cdot V}{K \cdot 10^{-3}},$$

где C — число микромолей нуклеотида в пробе; $E_{\lambda_{max}}$ — экстинкция 1 мл раствора при λ max; V — объем пробы (в мл); $K \cdot 10^{-3}$ — молярный коэффициент экстинкции, определенный для каждого нуклеотида при длине волны, соответствующей максимальному поглощению.

Коэффициенты молярной экстинкции пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов при рН 2 таковы:

Нуклеотиды	λmax (в нм)	$K \cdot 10^{-3}$
Адениловые	257	15,1
Гуаниловые	256	12,2
Уридиловые	262	10,0
Цитидиловые	280	13,0

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АТФ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Одним из вариантов количественного определения АТФ является метод, основанный на измерении нарастания содержания неорганического фосфата в безбелковом фильтрате после 7 мин кислотного гидролиза ее при 100°С. В присутствии глюкозо-1-фосфата, который при гидролизе 1 н. соляной кислотой подобно АТФ полностью расщепляется с образованием фосфорной кислоты, АТФ предварительно отделяют в виде ртутной соли. При обработке раствора ацетатом ртути АТФ осаждается в виде ртутного соединения, увлекая за собой только следы фосфора. Глюкозо-1-фосфат остается при этом в растворе.

Оборудование, реактивы. Центрифуга; пробирки стеклянные химические; пипетки градуированные на 1 и 3 мл; трихлоруксусная кислота (10%-ная); ацетат ртути (0,5%-ный и 20%-ный); соляная кислота (0,1 н. и 2 н.); гидроксид натрия (5 н.); фенолфталеин (0,5%-ный спиртовой); молибдат аммония (2,5%-ный) в серной кислоте (5 н.) (см. приложение); эйконоген (см. приложение); стандартный раствор фосфата (см. приложение).

К 1 мл исследуемого образца (кровь; гемолимфа насекомых; кислотные, водные и спиртовые вытяжки из тканей) прибавляют 1 мл холодного 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты для осаждения белков. Если работу ведут с кислоторастворимой фракцией ткани, то эту операцию опускают. Через 30 мин осадок белка отделяют центрифугированием при 3000 *g* в течение 10 мин. К надосадочной жидкости добавляют 0,5 мл 20%-ного раствора ацетата ртути, хорошо перемешивают и через 15 мин центрифугируют.

Надосадочную жидкость сливают и отбрасывают, а осадок 2 раза промывают 1—2 мл 0,5%-ного раствора ацетата ртути. Затем осадок растворяют в 1 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты, доводят водой до 3 мл и хорошо перемешивают. Из раствора отбирают по 1 мл в две пробирки. В одну пробирку добавляют 1 мл 2 н. раствора соляной кислоты, нагревают в течение 7 мин на кипящей водяной бане, охлаждают, добавляют каплю раствора фенолфталеина и нейтрализуют 5 н. раствором гидроксида натрия до слабо-розовой окраски. После нейтрализации проводят определение неорганического фосфора, который образовался в результате кислотного гидролиза АТФ, по прописи, приведенной на странице 179. В другой пробирке проводят определение неорганического фосфора, который увлекается ртутным осадком. Содержание АТФ определяют как разность между содержанием общего фосфора в пробе, подвергавшейся гидролизу, и количеством неорганического фосфора, найденным в ртутном осадке.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ РАСПАДА ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ

Конечными продуктами распада пуриновых оснований в процессе их обмена в организме являются мочевая кислота, аллантоин, аллантоиновая кислота, мочевина и глиоксилевая кислота, пиримидиновых оснований — карбаминовая кислота и β-аланин (см. учебник, с. 302—305).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ

Определение мочевой кислоты основано на ее способности восстанавливать фосфорно-вольфрамовый реактив в фосфорно-вольфрамовую синь. Количество фосфорно-вольфрамовой сини определяют путем титрования гексациано-(III)-ферратом калия. По этому методу мочевую кислоту можно определить в образцах, не содержащих белка.

Оборудоваиие, реактивы. Центрифуга; колбы конические на 50 мл; бюретка прямая с краиом иа 25 мл; пипетка градуированная на 1 мл; пипетки с одной меткой иа 2, 5 и 10 мл; трихлоруксусиая кислота (20%-иая); карбонат натрия (20%-иый); фосфорио-вольфрамовый реактив (см. приложение); стандартиый раствор мочевой кислоты (см. приложение); гексациано-(III)-феррат калия (1 г соли и 1 г гидроксила натрия растворяют в 50 мл воды).

Для работы используют кровь, гемолимфу насекомых, экстракты из тканей животных, мочу. Безбелковый образец получают следующим образом. К 5 мл биологической жидкости прибавляют равный объем 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают, осадок белков отделяют центрифугированием (3000 g, 10—15 мин). К 5 мл безбелкового супернатанта приливают 2 мл фосфорно-вольфрамового реактива и 10 мл 20%-ного раствора карбоната натрия. Смесь тщательно перемешивают. При этом появляется синее окрашивание, интенсивность которого пропорциональна количеству мочевой кислоты. Из бюретки осторожно, по каплям, титруют данную пробу раствором гексациано-(III)-феррата калия до обесцвечивания. Чтобы рассчитать содержание мочевой кислоты, необходимо знать, какое ее количество соответствует 1 мл гексациано-(III)-феррата калия. Для этого берут 0,5 мл стандартного раствора, содержащего 0,25 мг мочевой кислоты, смешивают его с 2 мл фосфорно-вольфрамового реактива и 5 мл 20%-ного раствора карбоната натрия. Образовавшуюся после взбалтывания фосфорно-вольфрамовую синь титруют раствором гексациано-(III)-феррата калия до обесцвечивания. Если, например, на титрование стандартной пробы пошло 3,8 мл гексациано-(III)-феррата калия, то 1 мл его соответствует (0,25:3,8) 0,066 мг мочевой кислоты. Если на титрование опытной пробы пошло 1,5 мл раствора гексациано-(III)-феррата калия, то содержание мочевой кислоты в безбелковом образце (2,5 мл биологической жидкости) будет равно (0,066×1,5) 0,099 мг, а в 100 мл биологической жидкости — (0,099×40) 3,96 мг.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРБАМИНОВЫХ КИСЛОТ И РОДСТВЕННЫХ ИМ СОЕДИНЕНИЙ

Оборудование, реактивы. Фотоэлектроколориметр; баня водяная; пробирки стеклянные химические; пипетки градуированные на 1 и 10 мл; серная кислота (конц., разб. вдвое); дифениламин-*п*-сульфонат натрия (1%-ный; хранить в темноте); диацетилмонооксим (3%-ный); персульфат калия (1%-ный; хранить в холодильнике).

К 3 мл исследуемого образца добавляют 6 мл разбавленной вдвое концентрированной серной кислоты, 0,1 мл раствора дифениламин-*п*-сульфоната натрия и 0,25 мл диацетилмонооксима. Содержимое пробирки перемешивают, закрывают пробкой, обработанной щелочью и снабженной короткой капиллярной трубкой, и помещают на 10 мин в кипящую водяную баню. Пробирку охлаждают в бане с холодной водой, после чего добавляют 0,25 мл раствора персульфата калия. Содержимое пробирки быстро перемешивают, закрывают, ставят на 1 мин в кипящую водяную баню и тотчас охлаждают, оберегая от прямого солнечного света. Через 10 мин пробу фотоколориметрируют с зеленым светофильтром. Содержание карбаминовой кислоты определяют по стандартной кривой.

ВИТАМИНЫ

В этом разделе изложены наиболее распространенные и легко осуществимые качественные реакции на некоторые витамины, а также методы их количественного определения в биологическом материале.

ВИТАМИН А (АНТИКСЕРОФТАЛМИЧЕСКИЙ, РЕТИНОЛ)

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИН А

Оборудование, реактивы. Штатив лабораторный с пробирками; пипетки градуированные на 1 и 2 мл; рыбий жир; витамин А (0,05%-ный) в хлороформе; хлорид сурьмы (III) (насыщ.) в хлороформе; уксусный ангидрид; уксусная кислота ледяная; сульфат железа (II); серная кислота (конц.).

Каплю рыбьего жира помещают в совершенно сухую пробирку, добавляют 4—5 капель насыщенного в хлороформе раствора хлорида сурьмы (III). Появляется синее окрашивание, которое постепенно переходит в розово-фиолетовое. Реакция не специфична, так как аналогичное синее окрашивание дают все соединения с сопряженными двойными связями. Выполнение этой реакции требует особой тщательности, так как присутствие влаги даже в ничтожных количествах приводит к образованию из хлорида сурьмы (III) хлороксида сурьмы, который не вступает в реакцию с витамином А и вызывает помутнение реакционной смеси. Для устранения следов воды рекомендуется добавить к реагирующим веществам 1—2 капли уксусного ангидрида.

Реакция с сульфатом железа (II)

К 1—2 каплям рыбьего жира или 0,05%-ного раствора витамина А в хлороформе добавляют 5—10 капель ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа (II) и 1—2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в розово-красное. Каротины дают при этой реакции зеленоватое окрашивание.

Реакция с серной кислотой (реакция Друммонда)

1 каплю рыбьего жира растворяют в 4—5 каплях хлороформа и прибавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, быстро переходящее в буро-красное.

В основе приведенной реакции лежит способность серной кислоты отнимать от витамина А воду с образованием цветных продуктов реакции.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А

Определение витамина А по реакции с 1,3-дихлор-2-пропанолом

Метод основан на реакции витамина А с соляной кислотой в 1,3-дихлор-2-пропаноле. Соединение, полученное в результате этой реакции, имеет розово-фиолетовую окраску. Его содержание определяют колориметрически.

Оборудование, реактивы. Фотоэлектроколориметр; водяная баня; ступка фарфоровая; делительная воронка на 100 мл; колба круглодонная с обратным воздушным холодильником (на 25 мл); пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл; печень; хлороформ (освобожденный от влаги и свежеперегнанный); диэтиловый эфир; гидриновый реактив (2 мл концентрированной HCl смешивают с 98 мл 1,3-дихлор-2-пропанола; раствор хранят в темном прохладном месте); гидроксид калия (20%-ный спиртовой); стандартный раствор (10 мг метилового фиолетового и 2,3 мг сафронина растворяют в 1 л дистиллированной воды; раствор можно хранить в течение 5 месяцев в темной склянке, из него готовят рабочий стандартный раствор, который используют в качестве эталона сравнения; к 12 мл рабочего стандартного раствора прибавляют 13 мл воды и тщательно перемешивают; 1 мл рабочего стандартного раствора по величине экстинкции (E) соответствует 0,03 мг витамина А).

5 г хорошо измельченной и растертой в фарфоровой ступке печени вносят в колбу с обратным воздушным холодильником, добавляют 10 мл 20%-ного спиртового раствора гидроксида калия, нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин до полного растворения ткани. Раствор переносят в делительную воронку и трижды экстрагируют порциями диэтилового эфира по 10—15 мл. Эфирные вытяжки соединяют и отмывают от щелочи в делительной воронке дистиллированной водой. Вытяжку сушат безводным сульфатом натрия, фильтруют, фильтр дважды промывают эфиром (по 5 мл). Эфир выпаривают на теплой водяной бане (или в вакууме в струе углекислого газа) и остаток растворяют в 5 мл хлороформа. В чистую сухую пробирку отмеряют 1 мл хлороформного раствора, прибавляют к нему 2 мл гидринового реактива. Энергично встряхивают и оставляют стоять в течение 5 мин при 25°С, после чего колориметрируют. Расчет проводят по формуле:

$$C = \frac{E \cdot 5 \cdot 100 \cdot 0,03 \cdot 3}{E_2 \cdot 5},$$

где C — количество витамина А в исследуемом материале (в мг %); E_1 — экстинкция испытуемого раствора; E_2 — экстинкция стандартного рабочего раствора.

Определение содержания каротина в растительном материале методом хроматографии на колонке

α-, β- и γ-каротины извлекают из растительного материала 96%-ным этиловым спиртом, а затем переводят их в бензин (или петролейный эфир). Из бензинового раствора удаляют каротиноидные пигменты (ксантофиллы, ликопин и др.) методом хроматографической адсорбции на колонке с оксидом алюминия (или оксидом магния). Количество каротина в очищенном бензиновом растворе (или растворе в петролейном эфире) определяют колориметрически. В качестве эталона сравнения используют раствор азобензола, который стандартизован по чистому каротину.

Оборудование, реактивы. Фотозлектроколорнметр; колонка (рис. 40); воронка делительиая иа 100 мл; колбы для фильтроваиня под вакуумом (Буизеиа) — 2 шт.; вороика Бюхнера (с наружным диаметром 110 мм); колбы мериые на 50 н 100 мл; цилиидры измерительные с носнком на 50 мл (2 шт.; терка; морковь или любой другой растнтельиый матернал); окснд алюмнння, просеянный через сито с отверстиями 0,25 мм, или окснд магиия, доведенный до постояниой массы нагреваннем в сушнльном шкафу прн 100—105°С; вата; кварцевый песок; стаидартный раствор азобеизола (растворяет 0,145 г перекристаллизованного азобензола в 100 мл 96%-ного этнлового спнрта и разбавляют в 10 раз 96%-иым спиртом); бензни (темп. кнпення 70—80°С) нлн петролейный эфнр (с темп. кип. 55—70°С); карбонат магния активированный (соль нагревают при 200°С в теченне 1 ч, затем рассыпают тоиким слоем иа стекле и оставляют иа воздухе иа 17—18 ч); карбоиат иатрня безводный; сульфат натрня безводиый.

10—20 г измельченной на терке моркови тщательно растирают в ступке с кварцевым песком и небольшим количеством безводного карбоната натрия. Затем в ступку приливают 50 мл 96%-ного этилового спирта и вновь растирают. После растирания материала со спиртом в ступку добавляют порциями 20—30 мл бензина (или петролейного эфира). Смесь снова тщательно растирают, после чего гомогенат фильтруют на воронке Бюхнера, ополаскивая дважды ступку бензином и промывая материал на фильтре небольшими порциями бензина до тех пор, пока не исчезнет окраска стекающего фильтрата. Бензиновый (или петролейный) фильтрат переносят в делительную воронку и смесь тщательно перемешивают. Пигменты, в том числе и каротины, переходят в верхний бензиновый (или петролейный) слой. Бензиновый раствор каротиноидов сушат безводным сульфатом натрия. Полученный бензиновый раствор пигментов пропускают через хроматографическую колонку (рис. 40), представляющую собой стеклянную трубку длиной 15—20 см и диаметром 1—1,5 см. Эту трубку вставляют в резиновую пробку, предварительно подобранную к колбе для отсасывания, соединенной с водоструйным насосом. В нижнюю часть адсорбционной колонки помещают небольшой ку-

сочек ваты и заполняют колонку на 5—7 см небольшими порциями кашицы из адсорбента и бензина (или петролейного эфира). Необходимо избегать образования пузырьков воздуха между адсорбентом и стенками трубки и следить за тем, чтобы перед началом адсорбции и во время ее верхний слой кашицы был покрыт небольшим слоем бензина (или петролейного эфира) во избежание прохождения воздуха в адсорбционную колонку. К подготовленной выше описанным образом колонке подключают насос, отрегулировав его таким образом, чтобы бензин равномерно пропитал весь адсорбент и скорость вытекания его из колонки составляла 25—30 капель в 1 мин. После этого в колонку наливают бензиновый раствор пигментов, не изменяя скорости отсасывания и следя за тем, чтобы на поверхности адсорбента постоянно был слой бензина. Бензин через колонку просасывают до тех пор, пока весь каротин не пройдет в приемник и вытекающий из колонки элюат перестанет быть окрашенным.

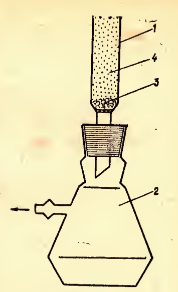


Рис. 40. Прибор для хроматографического разделения каротииоидов иа оксиде алюмииия:

1 — хроматографическая колонка; *2* — колба Бунзеиа; *3* — комочек из ааты; *4* — адсорбент

Хроматографическое разделение каротиноидов на оксиде алюминия представлено на рисунке 41.

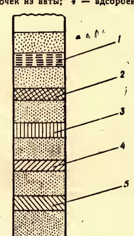


Рис. 41. Хроматографическое разделение каротииоидов иа оксиде алюмииия:

1 — ксантофялл; *2*—ликопин; *3* — α-каротин; *4* — β-каротин; *5*—γ-каротин.

Для количественного определения каротинов бензиновый элюат из колбы Бунзена количественно переносят в мерную колбу (на 50 или 100 мл в зависимости от объема жидкости) и доводят бензином до метки. Плотность окраски раствора каротинов сравнивают с таковой стандартного раствора азобензола (1 мл раствора азобензола соответствует 0,00235 мг α- или β-каротина).

Содержание каротинов в исследуемом материале вычисляют по формуле:

$$C = \frac{0{,}00235 \cdot 100 \cdot V \cdot E_1}{a \cdot E_2},$$

где C — содержание каротинов в исследуемом материале (в мг %); V — объем

бензинового раствора каротинов (в мл); E_1 — показание фотоколориметра для стандартного раствора азобензола; E_2 — показание фотоколориметра для исследуемого раствора каротина; a — масса материала (в г).

ВИТАМИН D (АНТИРАХИТИЧЕСКИЙ, КАЛЬЦИФЕРОЛ)

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИНЫ ГРУППЫ D

Оборудование, реактнвы. Пипеткн с одной меткой иа 1 мл (4 шт.); штатнв лабораториый с пробнркамн; рыбнй жнр; аинлнн; раствор брома в хлороформе (1 : 60); соляная кнслота (конц.).

Реакция с анилином

В сухую пробирку наливают 1 мл рыбьего жира и 1 мл смеси анилина с концентрированной соляной кислотой (15 : 1), перемешивают, осторожно нагревают при постоянном помешивании до кипения и кипятят 0,5 мин. При наличии витамина D желтая эмульсия делается сначала зеленой, а затем красной. Через 1—2 мин эмульсия делится на два слоя, из которых нижний окрашен в интенсивный красный цвет.

Бромхлороформная проба

В сухую пробирку наливают 1 мл рыбьего жира и 1 мл раствора брома в хлороформе (1 : 60). В присутствии витамина D возникает зеленовато-голубое окрашивание при нагревании на водяной бане в течение 1—2 мин.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА D

Оборудованне, реактивы. Фотоэлектроколориметр; баня водяная; воронка делнтельная иа 300 мл (2 шт.); коиическая колба с прнтертой пробкой иа 200 мл; набор пнпеток градунрованных иа 1, 5 н 10 мл; молочный жнр; этиловый спирт (96%-иый); гндроксид калня (50%-ный); диэтнловый эфир; сульфат натрия свежепрокаленный; хлороформ (промытый водой, высушенный иад безводным сульфатом натрня н перегнанный); хлорид сурьмы (III) (21—23%-ный) в хлороформе (безводный; рекомендуется храинть в темной склянке в эксикаторе над серной кислотой); ацетилхлорнд; основной раствор кальциферола (в 100 мл этилового спнрта растворяют 10 мг кальциферола, что соответствует 400 000 и. е. витамнна D_2; раствор устойчнв в теченне года при хранении в холодильннке).

В коническую колбу с воздушным обратным холодильником длиной 80 см вносят 10 г молочного жира, 40 мл 96%-ного этилового спирта и 8 мл 50%-ного раствора гидроксида калия. Колбу помещают в водяную баню, нагретую до температуры 85—90°С, на 40—50 мин. По окончании омыления содержимое колбы количественно переносят в делительную воронку и трижды экстрагируют диэтиловым эфиром (порциями 50; 25 и 25 мл). Эфирный

слой переносят в другую делительную воронку, где промывают его многократно водой до полного удаления щелочи (проба на фенолфталеин). К полученному эфирному экстракту добавляют 7 г свежепрокаленного сульфата натрия и высушивают его до полной прозрачности (15—20 мин), после чего фильтруют через бумажный фильтр. Эфир отгоняют на предварительно нагретой водяной бане до получения сухого остатка, который растворяют в 5 мл хлороформа. Из полученного раствора отбирают 1 мл, добавляют 3 капли ацетилхлорида и 6 мл раствора хлорида сурьмы (III). Через 4 мин интенсивность окраски измеряют в фотоэлектроколориметре при 500 нм. Фотометрирование ведут против смеси из 1 мл хлороформа, 6 мл раствора хлорида сурьмы (III) и трех капель ацетилхлорида. Содержание витамина D рассчитывают по калибровочному графику. Для получения калибровочного графика готовят серию растворов кальциферола в хлороформе, содержащих в 1 мл от 200 до 1000 и. е. витамина D, используя для этого основной раствор кальциферола и проводя цветную реакцию, как указано выше. Расчет ведут по формуле:

$$C = \frac{x \cdot V \cdot \rho}{a},$$

где C — содержание витамина D в 1 г жира (в и. е.); x — найденное по калибровочному графику количество витамина D в 1 мл раствора (в и. е.); V — разведение (мл); a — масса жира (г); ρ — плотность жира (г/см^3).

ВИТАМИН E (АНТИСТЕРИЛЬНЫЙ, ВИТАМИН РАЗМНОЖЕНИЯ, ТОКОФЕРОЛ)

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИН E

Оборудование, реактивы. Штатив лабораторный с пробирками; α-токоферол (0,1%-ный) в спирте (96%-ном); азотная кислота (конц.); хлорид железа (III).

Реакция с концентрированной азотной кислотой

В сухую пробирку берут 4—5 капель 0,1%-ного спиртового раствора α-токоферола, прибавляют 10 капель концентрированной азотной кислоты и содержимое пробирки встряхивают.

Пробирку помещают в водяную баню, нагретую до 70°C. Образуется эмульсия, которая постепенно расслаивается: верхний маслянистый слой приобретает красную окраску. Окрашивание обусловлено окислением α-токоферола до α-токоферилхинона, окрашенного в красный или желтовато-красный цвет.

Реакция с хлоридом железа (III)

В сухую пробирку берут 4—5 капель 0,1%-ного спиртового раствора α-токоферола, прибавляют 0,5 мл хлорида железа (III) и тщательно перемешивают содержимое пробирки.

Раствор окрашивается при нагревании в красный цвет в результате окисления токоферола хлоридом железа (III) в токоферилхинон:

$$\text{(HO, } H_3C\text{, 2 } CH_3\text{-хроман)}-CH_3 + FeCl_3 + H_2O \longrightarrow \text{(O=, } H_3C\text{, 2 } CH_3\text{-хинон)}-CH_2(\alpha)-CH_2(\beta)-C(\gamma)(OH)(CH_3)-R + FeCl_2 + HCl$$

где R — радикал изогексадекана (см. учебник, с. 195).

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА Е

Оборудование, реактивы. Фотоэлектроколориметр; водяная баня; воронка делительная на 200 мл; колбы круглодонные на 100 и 250 мл с обратным воздушным холодильником, колбы мерные на 25 мл (2 шт.); цилиндры измерительные с носиком на 25 мл (4 шт.); набор пипеток с одной меткой на 1, 2 и 5 мл; молоко; гидроксид калия (60%-ный); этиловый спирт (96%-ный); диэтиловый эфир; сульфат натрия (прокаленный); этиловый спирт (абсолютный); азотная кислота (ρ 1,4 г/см³); серия стандартных спиртовых растворов α-токоферола с возрастающей концентрацией от 100 до 400 мкг в 1 мл.

В колбу, снабженную воздушным обратным холодильником, вносят 100 мл молока, 25 мл 60%-ного раствора гидроксида калия и 20 мл 96%-ного этилового спирта. Колбу в течение 2 ч нагревают на кипящей водяной бане. Полученный гидролизат охлаждают, разбавляют 20 мл воды и количественно переносят в делительную воронку. Извлечение α-токоферола ведут диэтиловым эфиром, который вносят в делительную воронку в три приема: первая экстракция — 50 мл, две последующих — по 25 мл эфира. Соединенные вместе эфирные вытяжки промывают 3—4 раза дистиллированной водой в делительной воронке до полного удаления щелочи (по фенолфталеину) и высушивают прокаленным сульфатом натрия (5—7 г) до прозрачной жидкости. Экстракт фильтруют в колбу на 100 мл, а осадок на фильтре промывают небольшим количеством эфира, который присоединяют к основному экстракту. Эфир испаряют на водяной бане, а полученный сухой остаток растворяют в 5 мл абсолютного спирта и приливают 1 мл концентрированной азотной кислоты. Присоединяют к колбе обратный холодильник и нагревают ее для окисления α-токоферола 3 мин. В качестве контроля используют абсолютный этиловый спирт, 5 мл которого нагревают так же, как и исследуемый раствор, с 1 мл концентрированной азотной кислоты в течение 3 мин на кипящей водяной бане. Обе колбы охлаждают и остав-

ляют на 15 мин в темноте для развития окраски. Затем опытную и контрольную реакционные смеси переносят количественно в мерные колбы на 25 мл и доводят абсолютным спиртом до метки. Оптическую плотность окрашенного раствора находят на фотоэлектроколориметре с синим светофильтром (470 нм) против контроля и по величине ее определяют содержание витамина Е в исходном растворе по калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой 5 мл каждого из серии стандартных спиртовых растворов α-токоферола с определенной его концентрацией окисляют 1 мл концентрированной азотной кислоты на кипящей водяной бане в течение 3 мин. Дальнейшие операции идентичны с таковыми, описанными для контрольной и опытной проб. Полученные величины экстинкций окрашенных стандартных растворов откладывают по оси ординат, а соответствующие им количества α-токоферола — по оси абсцисс. Расчет ведут по формуле:

$$C = \frac{x \cdot V \cdot \rho}{a \cdot 1000},$$

где C — содержание витамина Е в 1 г испытуемого материала (в мг); x — найденное по калибровочной кривой количество витамина Е в 1 мл раствора (мкг); V — общий объем исследованного раствора с учетом всех разведений (мл); ρ — плотность исследованного раствора молока; a — масса молока (г); 1000 — коэффициент для перевода микрограммов в миллиграммы.

ВИТАМИН К (АНТИГЕМОРРАГИЧЕСКИЙ, ФИЛЛОХИНОН)

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИН К

Оборудование, реактивы. Пипетки градуированные на 1, 2 мл; штатив лабораторный с пробирками; викасол (0,1%-ный спиртовой) или метинон (0,2%-ный спиртовой); синтетические аналоги витамина К; цистеин (0,025%-ный); гидроксид натрия (10%-ный); диэтилмалоновый эфир (1%-ный); гидроксид калия (1%-ный); анилин (свежеперегнанный).

Реакция со щелочным раствором цистеина

В пробирку наливают 1 мл 0,1%-ного спиртового раствора викасола (или 0,2%-ного спиртового раствора метинона). Затем прибавляют 2 капли 0,025%-ного раствора цистеина и 2 капли 10%-ного раствора гидроксида натрия. Появляется желтое окрашивание.

Реакция с диэтилмалоновым эфиром

К 2 мл 0,1%-ного спиртового раствора викасола прибавляют 0,5 мл 1%-ного раствора диэтилмалонового эфира и 0,1 мл 1%-ного раствора гидроксида калия. Возникает фиолетово-красное окрашивание.

Реакция с анилином

К 2 мл 0,2%-ного раствора метинона в этиловом спирте добавляют 1 мл анилина, перемешивают. Смесь окрашивается в красный цвет:

$$2\,C_{11}H_8O_2 + H_2N{-}C_6H_5 \longrightarrow C_{17}H_{13}NO_2 + C_{11}H_{10}O_2$$

Метинон (2-метил-1,4-нафтохинон) + *Анилин* → *2-Метил-3-фениламино-1,4-нафтохинон (красного цвета)* + *2-Метил-1,4-диоксинафталин*

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА К

Метод основан на способности витамина К в щелочной среде давать с диэтилмалоновым эфиром окрашенное соединение (см. предыдущую работу), интенсивность окраски которого определяют колориметрически.

Оборудование, реактивы. Фотоэлектроколориметр; баня водяная; воронка Бюхнера с наружным диаметром 110 мм; колба для фильтрования под вакуумом (Бунзена); ступка фарфоровая с наружным диаметром 110 мм; колбы мерные на 10 мл (2 шт.); пипетки градуированные на 1 мл (4 шт.); терка; морковь; кварцевый песок; диэтиловый эфир; хлороформ (освобожденный от влаги и свежеперегнанный); карбонат натрия безводный; сульфат натрия безводный; диэтилмалоновый эфир (1%-ный спиртовой); гидроксид калия (1%-ный); стандартный раствор витамина К (0,04 мкг в 1 мл).

10—15 г измельченной на терке моркови тщательно растирают в ступке с кварцевым песком и небольшим количеством карбоната натрия. Затем в ступку приливают 10 мл диэтилового эфира и вновь растирают. Гомогенат переносят на воронку Бюхнера, дважды ополаскивая ступку небольшими порциями эфира. Фильтруют и трижды промывают осадок на фильтре тем же экстрагентом. Эфирные вытяжки соединяют и сушат безводным сульфатом натрия, после чего эфир выпаривают на теплой водяной бане, а остаток растворяют в 5 мл хлороформа. К полученному раствору прибавляют 1 мл 1%-ного спиртового раствора диэтилмалонового эфира и 0,2 мл 1%-ного раствора гидроксида калия. Общий объем доводят водой в мерной колбе до 10 мл. Одновременно ставят определение со стандартным раствором витамина К. Окрашенный раствор колориметрируют.

Рассчитывают содержание витамина К:

$$C = \frac{E_1 \cdot 0{,}2 \cdot 100}{E_2 \cdot a},$$

где C — содержание витамина К (в мкг %); a — масса вещества (в г); E_2 — экстинкция стандартного раствора; E_1 — экстинкция испытуемого раствора.

ВИТАМИН B_1 (АНТИНЕВРИТНЫЙ, ТИАМИН)

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИН B_1

Оборудование, реактивы. Облучатель ультрафиолетовый для обнаружения витаминов в растворе (модель 833); пипетки с одной меткой на 1 мл (2 шт.); штатив лабораторный с пробирками; основной раствор сульфаниловой кислоты для получения диазореактива (0,9 г сульфаниловой кислоты растворяют в 9 мл концентрированной соляной кислоты с последующим разбавлением дистиллированной водой до 200 мл); нитрит натрия (5%-ный); карбонат натрия (10%-ный); тиаминхлорид; гидроксид натрия (10%-ный); гексациано-(III)-феррат калия (5%-ный); изобутиловый спирт.

Взаимодействие витамина B_1 с диазореактивом

К 5 каплям основного раствора сульфаниловой кислоты прибавляют 5 капель 5%-ного раствора нитрита натрия. К полученному раствору диазореактива добавляют небольшое количество (на кончике скальпеля) тиаминхлорида и 5—7 капель 10%-ного раствора карбоната натрия. Жидкость окрашивается в розовый цвет.

Реакция окисления тиамина в тиохром

К 2—3 мг тиаминхлорида в пробирке добавляют 5—10 капель 5%-ного раствора гексациано-(III)-феррата калия и 2 мл 30%-ного гидроксида натрия, содержимое тщательно перемешивают. При нагревании жидкость окрашивается в желтый цвет вследствие превращения тиамина в тиохром. Далее в пробирку вносят 1 мл изобутилового спирта и содержимое интенсивно взбалтывают в течение 1 мин. Наблюдают голубую флюоресценцию этого раствора в ультрафиолетовых лучах.

$$[\text{Тиаминхлорид}]Cl^- + 2K_3[Fe(CN)_6] + 3KOH \longrightarrow \text{Тиохром} + 2K_4[Fe(CN)_6] + KCl + 3H_2O$$

Тиаминхлорид

Тиохром

Флюорометрическое определение витамина B_1

При окислении тиаминхлорида гексациано-(III)-ферратом калия в щелочной среде образуется тиохром, обладающий сильной голубой флюоресценцией в ультрафиолетовых лучах. Для количественного определения тиамина сравнивают флюоресценцию

окисленных стандартных растворов тиаминхлорида и испытуемых растворов на флюорометре.

Оборудование, реактивы. Флюорометр; термостат на 45°C; баня водяная; ступка фарфоровая; колба мерная на 100 мл; воронки делительные на 20 мл (2 шт.) и 100 мл; пипетки градуированные на 1 и 5 мл (по 2 шт.); пробирки с притертыми пробками; ферментный препарат фосфатазы (мицелий гриба Penicillium высушивают при 45°C и используют в качестве ферментного препарата); 2%-ный гексациано-(III)-феррат калия (готовится перед работой); гидроксид натрия (30%-ный); серная кислота (0,1 н.); изоамиловый спирт; толуол; ацетат натрия (2,5 М), содержащий ферментный препарат фосфатазы (100 мг сухого мицелия гриба настаивают с 10 мл 2,5 М раствора ацетата натрия в течение 1 ч, после чего фильтруют); стандартный раствор тиаминхлорида (10 мг тиаминхлорида растворяют в 100 мл 0,01 н. соляной кислоты, 1 мл полученного раствора доводят водой до 10 мл. В 1 мл последнего раствора содержится 1 мкг тиаминхлорида).

5—10 г семян гречихи (или другого растительного материала) тщательно растирают в фарфоровой ступке с 10—15 мл 0,1 н. раствора серной кислоты, которую добавляют небольшими порциями. Растертый материал количественно переносят в колбу на 100 мл и доводят объем смеси до 75 мл раствором 0,1 н. серной кислоты. Содержимое колбы нагревают в течение 45 мин на кипящей водяной бане при частом помешивании. После охлаждения в колбу прибавляют несколько капель толуола и 5 мл 2,5 М раствора ацетата натрия, содержащего ферментный препарат фосфатазы (pH 4—4,5). Для высвобождения связанного тиамина колбу выдерживают 2 ч в термостате при 40—45°C. После охлаждения содержимое колбы переносят в мерную колбу на 100 мл, доводят до метки, хорошо перемешивают и фильтруют. Для освобождения от примеси других флюоресцирующих веществ к 50 мл полученного фильтрата добавляют 25 мл изоамилового спирта и встряхивают в течение 2 мин. После расслаивания смеси в делительной воронке спирт отбрасывают. Повторяют эту операцию 2—3 раза. Дальнейшую работу ведут с водной вытяжкой. Количество гексациано-(III)-феррата калия, необходимое для окисления тиамина, подбирают эмпирически. С этой целью в 6 пробирок с притертыми пробками наливают по 2 мл 30%-ного раствора гидроксида натрия и по 5 мл полученной водной вытяжки тиамина, добавляя в пять из них окислитель в количестве 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 и 0,5 мл соответственно. Содержимое пробирок интенсивно встряхивают в течение 2 мин. В некоторых пробирках возникает желтая окраска. Тот объем окислителя, при добавлении которого появляется желтая окраска, не исчезающая в течение последующих 30 с после встряхивания, используют далее при проведении определения тиамина.

В две делительные воронки наливают по 2 мл 30%-ного раствора гидроксида натрия и в одну из них (опытная проба) — подобранное эмпирически требуемое количество 2%-ного раствора гексациано-(III)-феррата калия, после чего оба раствора тщательно перемешивают. Далее пипеткой в обе воронки быстро вносят по 5 мл исследуемого раствора и содержимое воронок вновь

перемешивают. Затем в каждую воронку добавляют по 10 мл изоамилового спирта и в течение 2 мин интенсивно встряхивают. После расслаивания смеси слой воды удаляют, а изоамиловый слой промывают еще 5 мл воды. В воронки добавляют по 2 мл этилового спирта для осветления растворов. Опытную и контрольную смеси вновь встряхивают и измеряют их флюоресценцию. Стандартный раствор тиамина окисляют так же, как и испытуемый, используя для этого 0,05 мл окислителя. Для стандартного раствора находят поправку на флюоресценцию сопутствующих веществ, для чего 1 мл стандартного раствора тиамина обрабатывают вышеописанным способом без добавления окислителя. Содержание тиамина в исследуемом материале находят по формуле:

$$C = \frac{(A - B) \cdot V}{(A_1 - B_1) \cdot V_1 \cdot a},$$

где C — содержание тиамина (в мкг); A — показания флюорометра для испытуемого окисленного раствора; B — показания флюорометра для испытуемого раствора без окисления; A_1 — показания флюорометра для 1 мкг окисленного тиамина; B_1 — показания прибора для 1 мкг неокисленного тиамина; V — общий объем экстракта (в мл); V_1 — объем экстракта, взятый для определения; a — масса материала (в г).

ВИТАМИН B_2 (РИБОФЛАВИН)

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ВИТАМИН B_2

Оборудование, реактивы. Штатив лабораторный с пробирками; рибофлавин (в таблетках); соляная кислота (конц.); цинк гранул.

$^1/_{10}$ часть таблетки рибофлавина растворяют в 0,5 мл воды, наблюдают окрашивание и флюоресценцию раствора. В раствор добавляют 10 капель концентрированной соляной кислоты и небольшой кусочек металлического цинка. Жидкость постепенно окрашивается в розовый цвет, а затем обесцвечивается. Реакция обусловлена восстановлением рибофлавина выделяющимся водородом сначала в родофлавин красного цвета, а затем в бесцветный лейкофлавин. При взбалтывании обесцвеченного раствора лейкосоединение вновь окисляется кислородом воздуха в рибофлавин:

$H_2C-(CHOH)_3-CH_2OH$ … $\xrightarrow{Zn + 2HCl}$ … $H_2C-(CHOH)_3-CH_2OH$

Рибофлавин *Лейкофлавин*

Флюорометрическое определение витамина B_2 (по Одинцовой)

Оборудование, реактивы. Флюорометр марки ЭФ-3М; встряхиватель; ступка фарфоровая; воронка делнтельная иа 50 мл; набор пнпеток градуироваиных на 1, 2 и 10 мл; пробирки калиброваиные на 10 мл (2 шт.); профильтроваиная вытяжка из растительного материала после ннкубации с препаратом фосфатазы (с. 202); пермангаиат калия (4%-иый); пероксид водорода (3%-иый); $Na_2S_2O_4 \cdot 2H_2O$; гидрокарбонат иатрия (2%-иый); стандартиый раствор рибофлавииа (10 мг рибофлавииа растворяют в 250 мл воды, насыщеииой толуолом и содержащей несколько капель уксусиой кислоты; из иего готовят стандартный рабочнй раствор разведением в 100 раз; в 1 мл этого раствора содержится 0,4 мкг рибофлавина).

В одиу нз калиброванных пробнрок наливают 8 мл профнльтроваиной вытяжкн (с. 202), в другую — 1 мл стандартного рабочего раствора рнбофлавнна н 7 мл воды. Далее по каплям в обе пробиркн прилнвают равные объемы 4%-ного раствора перманганата калия до возникновения слабо-розовой окраскн (обычно не более 1 мл). Спустя 10 мнн в обе пробирки прнбавляют также по каплям 3%-ный раствор пероксида водорода для разрушеиия избытка пермангаиата (2—5 капель). Объемы получеииых растворов доводят днстнллированиой водой до 10 мл и затем измеряют флюоресцеицию.

По окончании флюорометрироваиия в обе пробирки добавляют по 0,2 мл рабочего раствора $SnCl_2$ и 0,1 мл $Na_2S_2O_4$ для тушения флюоресцеицин B_2 н нзмеряют флюоресценцию примесей. Вычнсленне содержания витамина B_2 ведут по формуле:

$$C = \frac{(A - B) \cdot 0{,}4 \cdot V \cdot V_1}{(A_1 - B_1) \cdot V_2 \cdot a},$$

где C—содержанне рнбофлавнна в 1 г иселедуемого материала (в мкг); A — показаиня флюорометра для опытного раствора; B — показання флюорометра для опытного раствора после тушення флюоресценцин рнбофлавнна; A_1 — показаиия флюорометра для стандартного раствора рибофлавииа; B_1 — показання флюорометра для стаидартного раствора рибофлавина после тушеиия флюоресцеицнн; 0,4 — содержанне витамииа в 1 мл стаидартиого раствора (в мкг); V — объем экстракта перед измереннем флюоресцеицин (10 мл); V_1 — объем всей вытяжки (100 мл); V_2 — объем вытяжки, взятой для анализа (8 мл); a — масса взятого для прнготовления вытяжкн растнтельиого материала (в г).

ВИТАМИН B_6

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ПИРИДОКСИН (ОБНАРУЖЕНИЕ ПИРИДОКСИЛОВОЙ КИСЛОТЫ В МОЧЕ)

Витамнн B_6 выделяется нз органнзма в виде пнрндоксиловой кнслоты. Ее лактои интенснвно флюоресцирует снннм светом при освещенин раствора ультрафнолетовымн лучамн.

Оборудование, реактивы. Флюорометр; баня водяная; пробирка микрохимическая; моча; соляная кислота (10%-ная); гидроксид натрия (10%-ный); тетраборат натрия (1%-ный).

В микрохимическую пробирку вносят 3 капли мочи и столько же 10%-ного раствора соляной кислоты. Пробирку помещают в кипящую водяную баню на 20 мин для получения лактона пиридоксиловой кислоты. Далее пробирку охлаждают, добавляют в нее 3 капли 10%-ного раствора гидроксида натрия (pH 9,0) и 1%-ный раствор тетрабората натрия до $^1/_2$ объема пробирки. В полученном растворе наблюдают синее свечение.

$$\text{4-Пиридоксиловая кислота} + HCl \longrightarrow [\text{Лактон 4-пиридоксиловой кислоты}]\,\bar{Cl} + H_2O$$

4-Пиридоксиловая кислота — *Лактон 4-пиридоксиловой кислоты*

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ 4-ПИРИДОКСИЛОВОЙ КИСЛОТЫ (ПО ХАФФУ И ПЕРЛЦФЕЙГУ)

Оборудование, реактивы. Флюорометр; баня водяная; пробирки с притертыми пробками, калиброванные на 5 и 10 мл (4 шт.); пипетки с одной меткой на 2 мл (5 шт.); чашки выпаривательные на 5 мл (2 шт.); универсальный индикатор; моча, подкисленная уксусной кислотой (50%-ной) и профильтрованная; тетраборат натрия; соляная кислота (0,1 н.); соляная кислота (ρ 1,19), разведенная в 10 раз; стандартный раствор лактона 4-пиридоксиловой кислоты (10 мг лактона пиридоксиловой кислоты растворяют в 25 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты. Из этого раствора разведением в 10 раз 0,1 н. соляной кислотой готовят разбавленный рабочий раствор, в 1 мл которого содержится 40 мкг лактона).

В 2 пробирки на 10 мл с притертыми пробками наливают по 1 мл отфильтрованной мочи и доводят объем до 10 мл разведенной соляной кислотой (1 : 10). Затем одну из пробирок (опыт) закрывают пробкой и ставят в кипящую водяную баню на 15 мин (для образования лактона), а другую (контроль) оставляют без нагревания. Спустя 15 мин опытную пробирку охлаждают. Из каждой пробирки берут пробы по 0,5 мл и помещают их в две другие чистые пробирки, градуированные на 5 и 10 мл, добавляют в них 0,5 г тетрабората натрия и объем доводят до 10 мл дистиллированной водой. После растворения тетрабората натрия проверяют pH раствора (с помощью универсального индикатора); при pH 9 появляется зеленая окраска со слабым синим оттенком. На флюорометре сравнивают интенсивность флюоресценции опытной и контрольной проб со стандартным раствором лактона при 450 нм. В последнем случае к 0,1 мл стандартного раствора лактона добавляют 9,9 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты (в 1 мл полученного раствора содержится 0,4 мкг лактона). Из этого разбавленного раствора берут 1 мл, добавляют к нему 9 мл дистил-

лированной воды и подщелачивают, прибавляя к содержимому пробирки 0,5 г тетрабората натрия (pH проверяют по универсальному индикатору). Полученный таким образом стандартный раствор, содержащий 0,04 мкг лактона в 1 мл, флюорометрируют. Расчет содержания 4-пиридоксиловой кислоты проводят по следующей формуле:

$$C = \frac{(A - B) \cdot 0,04 \cdot 200 \cdot 1,109 \cdot V}{b \cdot 1000},$$

где C — содержание 4-пиридоксиловой кислоты (в мг); A — интенсивность флюоресценции опытного образца; B — интенсивность флюоресценции контрольного образца; V — общий объем мочи; 0,04 — содержание лактона пиридоксиловой кислоты (в мкг в 1 мл); 200 — разведение мочи; b — показания флюорометра для стандартного раствора лактона 4-пиридоксиловой кислоты; 1000 — коэффициент для перевода данных (мкг в мг); 1,109 — коэффициент пересчета для перехода от лактона 4-пиридоксиловой кислоты к 4-пиридоксиловой кислоте.

ВИТАМИН B_{12} (АНТИАНЕМИЧЕСКИЙ, ЦИАНКОБАЛАМИН)

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ВИТАМИН B_{12} (ОБНАРУЖЕНИЕ КОБАЛЬТА В ЕГО СОСТАВЕ)

При сплавлении цианкобаламина с гидросульфитом калия или под действием сильного окислителя происходит его разрушение, и освободившийся кобальт может быть обнаружен α-нитрозо-β-нафтолом или 1-нитрозо-2-нафтол-3 6-дисульфонатом натрия (нитрозо-β-солью), с которыми он образует растворимую комплексную соль оранжево-красного цвета (выпадающую при высокой концентрации ее в виде пурпурного осадка). Состав этого соединения отвечает формуле $(C_{10}H_6O_2N)_3Co$. Образование внутрикомплексных связей зависит от расположенных рядом группировок NOH и O:

NO, OH ⇌ NOH, O

Оборудование, реактивы. Тигель фарфоровый; красная лакмусовая бумага; препарат витамина B_{12} (ампула обычно содержит 15 мкг витамина в 1 мл); азотная кислота (конц.); соляная кислота (конц.); α-нитрозо-β-нафтол (1%-ный, в ацетоне); гидрофосфат натрия (10%-ный).

$^1/_3$ содержимого ампулы переносят в фарфоровый тигель, упаривают досуха и прокаливают на маленьком пламени горелки. По охлаждении добавляют 1 мл концентрированной азотной кис-

лоты и 3 мл концентрированной соляной кислоты и кипятят под тягой до полного испарения жидкости. По остывании растворяют остаток в 1 капле воды, прибавляют 1 каплю 1%-ного раствора α-нитрозо-β-нафтола в ацетоне и по каплям 10%-ный раствор гидрофосфата натрия до слабощелочной реакции (по лакмусу). В присутствии иона Co^{3+} развивается буро-красное окрашивание. В отсутствие Co^{3+} окраска желто-зеленая.

ВИТАМИН С
(АНТИСКОРБУТНЫЙ, АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА)

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИН С

Качественные реакции на витамин С основаны на его способности легко вступать в окислительно-восстановительные реакции и восстанавливать, например, метиленовую синь, 2,6-дихлорфенолиндофенол, гексациано-(III) феррат калия, нитрат серебра и др.

Оборудование, реактивы. Термостат на 40°C; пипетки с одной меткой на 1 мл (5 шт); штатив лабораторный с пробирками; сок капусты или картофеля (или 0,002% ный раствор аскорбиновой кислоты); метиленовый синий (0,01%-ный); гексациано-(III) феррат калия (5%-ный); гидроксид калия (5%-ный); соляная кислота (10%-ная); хлорид железа (1%-ный); уксусная кислота (10%-ная); 2,6-дихлорфенолиндофенол (свежеприготовленный; 0,02%-ный).

Взаимодействие с метиленовой синью

К 1 мл сока капусты (или картофеля) в пробирке прибавляют 1 мл 0,01%-ного раствора метиленовой сини, перемешивают и закрывают пробкой для предохранения от соприкосновения с кислородом воздуха. Пробирку помещают в термостат при 37—40°C. Через некоторое время жидкость в пробирке обесцвечивается за счет восстановления метиленовой сини в бесцветную лейкоформу и образования дегидроаскорбиновой кислоты. Уравнение перехода L-аскорбиновой кислоты в L-дегидроаскорбиновую дано в учебнике (см. с. 215), а превращение метиленовой сини в лейкоформу приведено выше (см. с. 132). Если затем бесцветный раствор метиленовой сини энергично встряхнуть, не препятствуя поступлению воздуха в пробирку, то раствор вновь приобретает синий цвет.

Реакция с гексациано-(III) ферратом калия

Аскорбиновая кислота, окисляясь, восстанавливает гексациано-(III) феррат калия $K_3[Fe(CN)_6]$ до гексациано-(II) феррата калия $K_4[Fe(CN)_6]$, который с ионом железа в степени окисления +3

образует в кислой среде гексациано-(II) феррат железа (берлинскую лазурь, $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$):

$$\text{L-аскорбиновая кислота} + 2K_3[Fe(CN)_6] + 2KOH \longrightarrow \text{L-дегидроаскорбиновая кислота} + 2K_4[Fe(CN)_6] + 2H_2O$$

$$3K_4Fe(CN)_6 + 4FeCl_3 \longrightarrow Fe_4[Fe(CN)_6]_3 + 12KCl$$

Берлинская лазурь (синий осадок)

К 1 мл сока капусты прибавляют 2 капли раствора гидроксида калия, 2 капли раствора гексациано-(III) феррата калия и энергично встряхивают содержимое пробирки. Затем в пробирку добавляют 6—8 капель 10%-ного раствора соляной кислоты и 1—2 капли раствора хлорида железа (III), выпадает синий (или зеленовато-синий) осадок берлинской лазури.

Реакция с 2,6-дихлорфенолиндофенолом

К 1 мл сока капусты (или картофеля) прибавить 1 мл 0,02%-ного раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, содержимое перемешать. Раствор обесцвечивается за счет образования лейкоформы индикатора. При дальнейшем прибавлении индикатора раствор окрашивается в розовый цвет, так как вся аскорбиновая кислота в пробе уже окислена и 2,6-дихлорфенолиндофенол больше не восстанавливается.

$$\text{L-Аскорбиновая кислота} + O{=}C_6H_2Cl_2{=}N{-}C_6H_4{-}ONa \longrightarrow$$

L-Аскорбиновая кислота   *2,6-Дихлорфенолиндофенол (окрашенная, окисленная форма)*

$$\longrightarrow \text{L-Дегидроаскорбиновая кислота} + HO{-}C_6H_2Cl_2{-}NH{-}C_6H_4{-}ONa$$

L-Дегидроаскорбиновая кислота   *2,6-Дихлорфенолиндофенол (бесцветная, восстановленная форма)*

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА С

Колнчественное определение витамина С в нсследуемом материале осуществляют с помощью 2,6-днхлорфенолиндофенола, нспользуя его тнтрованный раствор. По количеству реактнва, израсходованного на окисление витамнна С, определяют содержание последнего в анализируемом матернале.

Оборудоваине, реактнвы. Бюретки прямые с краном на 5 мл (2 шт.); пипетки с одной меткой на 2, 5 и 20 мл; колбы коннческие на 50 и 100 мл; стаканы стеклянные лабораторные иа 100 мл (4 шт.); колбы мерные иа 100 мл (2 шт.); цилиндр измернтельный с иосиком иа 250 мл; ступка фарфоровая с иаружным диаметром 110 мм; стекло часовое; песок кварцевый; картофель; морковь; томатный сок; шиповник; соляиая кислота (5%-ная); 2,6-дихлорфеиолиндофеиол (0,001 н.) (см. приложеиие); метафосфорная кислота (2%-ная и 4%-иая); аскорбииовая кислота (0,1%-ная); иодат калия (0,001 н.) (см. приложеиие); иодид калия; крахмал (1%-иый); иодид калия (5%-ный); пероксид водорода (3%-ный).

Определение титра раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола

Установку титра приблизительно 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола проводят по аскорбиновой кислоте в день работы. Берут 2 мл 0,1%-ного раствора аскорбнновой кнслоты и растворяют в 50 мл 2%-ного раствора метафосфорной кнслоты (или серной кнслоты); 5 мл этого раствора тнтруют 2,6-дихлорфенолнндофенолом до появления розового окрашивання. Отмечают затраченный на тнтрование объем реагента. Тотчас же после этого такой же объем раствора аскорбиновой кнслоты тнтруют нз другой микробюретки тнтрованным раствором иодата калия (0,001 н.). К раствору аскорбиновой кислоты перед титрованием добавляют несколько кристаллов (не более 0,1 г) иодида калия н 5 капель 1%-ного раствора крахмала. Титрование ведут осторожно до появлення едва заметного синего окрашивания и отмечают затраченный на тнтрование объем нодата калия. Так как в первом н во втором случае были оттитрованы однnаковые объемы аскорбиновой кислоты, то, следовательно, количества затраченных иодата калня н реагента эквивалентны друг другу. Так как 1 мл 0,001 н. раствора нодата калия эквнвалентен 0,088 мг аскорбиновой кислоты, то тнтр раствора 2,6-дихлорфенолнндофенола (в мнллиграммах аскорбиновой кислоты) равен:

$$T = \frac{0{,}088 \cdot V_2}{V_1},$$

где V_1 н V_2 — объемы растворов 2,6-дихлорфенолиндофенола и нодата калия, соответственно затраченные на титрование равных объемов раствора аскорбиновой кислоты.

Приготовление экстракта из растительного материала

Нарезают исследуемый материал (картофель, морковь) мелкими кусочками. 10 г материала переносят в ступку и тщательно растирают с небольшим количеством кварцевого песка, добавляя маленькими порциями 4%-ный раствор метафосфорной кислоты до получения жидкой кашицы. Смесь количественно переносят в мерную колбу на 100 мл. Ступку и пестик тщательно обмывают 4%-ным раствором метафосфорной кислоты, которую сливают в ту же мерную колбу, следя за тем, чтобы были затрачены все 50 мл метафосфорной кислоты (конечная концентрация ее должна быть 2%, в случае отсутствия метафосфорной кислоты ее заменяют 5%-ным раствором соляной кислоты с конечной ее концентрацией в 25%). После этого содержимое мерной колбы доводят до метки дистиллированной водой, хорошо перемешивают и фильтруют через складчатый фильтр или центрифугируют. Полученный экстракт должен быть совершенно прозрачным.

Определение содержания аскорбиновой кислоты в экстракте

В две конические колбочки на 50 мл берут пипеткой по 10 мл полученного экстракта растительного материала. В одной из проб разрушают витамин С кипячением в присутствии нескольких капель пероксида водорода. Содержимое колб титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола. При наличии в экстракте витамина С раствор обесцвечивается, а при дальнейшем прибавлении индикатора окрашивается в розовый цвет, так как вся аскорбиновая кислота в пробе уже окислена и краска более не восстанавливается. В пробе, где витамин С был разрушен, от прибавления нескольких капель индикатора появляется розовое окрашивание. Результаты титрования записывают и повторяют работу с новой порцией того же экстракта. На основании средней величины титрования, полученной из 2—3 определений, вычисляют количество витамина С по формуле:

$$C = \frac{100 \cdot V_1 \cdot V \cdot T}{a \cdot V_2},$$

где C — содержание аскорбиновой кислоты (в мг%); T — титр 2,6-дихлорфенолиндофенола в миллиграммах аскорбиновой кислоты (см. выше); V — объем экстракта (в мл); a — масса исследуемого материала (в г); V_1 — затраченный объем реагента при титровании (в мл); V_2 — объем титруемого раствора (в мл).

В результате находят количество витамина С в миллиграммах на 100 г исследуемого продукта. По данному методу определяют только восстановленную форму аскорбиновой кислоты.

ВИТАМИН PP (АНТИПЕЛЛАГРИЧЕСКИЙ)

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИН PP

Оборудование, реактивы. Баня водяная; пипетки с одной меткой на 1, 2 и 5 мл; колба коническая на 25 мл; чашка выпарительная вместимостью 25 мл; никотиновая кислота (0,1%-ная) или ее амид; 2,4-динитрохлорбензол (1%-ный спиртовой); роданбромидный раствор (см. приложение); спиртовой раствор анилина (свежеперегнанный анилин растворяют в 96%-ном этиловом спирте в соотношении 1 : 6); этиловый спирт (96%-ный); гидроксид натрия (10%-ный спиртовой); спиртовая фосфатная буферная смесь pH 5,29 (1 : 1; см. приложение).

Реакция с 2,4-динитрохлорбензолом

В выпаривательную чашку отмеряют 1—2 мл 0,1%-ного раствора никотиновой кислоты (или ее амида) и раствор упаривают досуха на водяной бане. К сухому остатку добавляют 1—2 мл спиртового раствора 2,4-динитрохлорбензола и тщательно перемешивают стеклянной палочкой. Полученный раствор вновь упаривают на водяной бане досуха (вследствие токсичности паров 2,4-динитрохлорбензола *упаривание проводить под тягой!*), после чего нагревание продолжают еще в течение 10—15 мин. Выпаривательную чашку охлаждают до комнатной температуры и к осадку добавляют 5—10 мл спиртового раствора гидроксида натрия. Появляется красновато-фиолетовая окраска. При стоянии окраска бледнеет и постепенно исчезает.

Реакция с роданбромидом

В коническую колбу на 25 мл вносят 5 мл раствора никотиновой кислоты, нагревают до 70°С, после чего прибавляют 1 мл роданбромидного раствора и 2 мл спиртового раствора анилина. Содержимое колбы перемешивают и добавляют 10 мл спиртового раствора буфера. Через некоторое время раствор окрашивается в желтый цвет.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА PP ПО РЕАКЦИИ С РОДАНБРОМИДОМ

Оборудование, реактивы. Фотоэлектроколориметр; центрифуга; колба круглодонная на 250 мл с обратным воздушным холодильником; баня водяная; воронка Бюхнера с наружным диаметром 130 мм; колбы Бунзена (2 шт.); колбы мерные на 10, 25 и 100 мл; пипетки с одной меткой на 1 и 2 мл; асканит (отбеливающая глина); соляная кислота (1 н.); гидроксид натрия (1 н. и 40%-ный); безводный фосфат калия; ацетат свинца; этиловый спирт (96%-ный); спиртовой фосфатный буфер с pH 5,29 (1 : 1) (см. приложение); роданбромидный реактив (к 10 мл 0,1 н. раствора роданида калия или роданида аммония прибавляют 1 г кристаллического бромида калия и 1 мл 17%-ного раствора соляной кислоты; к полученной смеси под тягой прилнвают 2 мл брома); спиртовой раствор анилина (свежеперегнанный анилин растворяют в этиловом спирте в соотношении 1 : 6; хранят в темной склянке); стандартный водно-спиртовой (1 : 1) раствор никотиновой кислоты (10 мг в 1 мл).

50 г тонко размолотого сухого растительного материала заливают в круглодонной колбе на 250 мл с обратным воздушным холодильником 100 мл 1 н. раствора соляной кислоты и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 ч. По охлаждении прибавляют 40%-ный раствор щелочи до pH 6,5. К полученной смеси приливают 100 мл этилового спирта и выпавший осадок отделяют фильтрованием. В фильтрат вносят 2 г асканита и после интенсивного встряхивания в течение 5 мин отфильтровывают его на воронке Бюхнера. Осадок на фильтре заливают 20 мл 1 н. раствора гидроксида натрия для элюции никотиновой кислоты. Элюат переносят в центрифужную пробирку, в которую предварительно насыпают 1 г ацетата свинца, и в присутствии фенолфталеина нейтрализуют его прибавлением кристалликов фосфата калия до появления слабо-розовой окраски, после чего разбавленной соляной кислотой (1 : 1) доводят pH раствора до 6,0. Смесь центрифугируют при 3000 *g*. Прозрачный супернатант переносят в мерную колбу на 25 мл и доводят объем водой до метки. 5 мл приготовленной вышеописанным способом вытяжки нагревают до 70°С, прибавляют 1 мл свежеприготовленного роданбромидного реактива и 2 мл спиртового раствора анилина, перемешивают и количественно переносят в мерную колбу на 10 мл, доводя объем жидкости до метки спиртовым раствором буфера. Оставляют при комнатной температуре на 1,5 ч, после чего фильтруют и желтый фильтрат колориметрируют при 440 нм. Содержание витамина PP рассчитывают по калибровочной кривой, которую строят по результатам колориметрирования серии стандартных растворов, приготовленных из исходного стандартного раствора с содержанием 10 мг никотиновой кислоты в 1 мл. К 5 мл соответствующего стандартного раствора добавляют все указанные выше для испытуемого раствора реактивы в той же последовательности и по истечении 1,5 ч измеряют интенсивность окраски на фотоэлектроколориметре.

ВИТАМИН Р (ВИТАМИН ПРОНИЦАЕМОСТИ, ЦИТРИН)

К веществам Р-витаминного действия относится ряд соединений фенольной природы, уменьшающих проницаемость и повышающих прочность стенок кровеносных сосудов. Они угнетают активность холинэстеразы, сукцинатдегидрогеназы и некоторых других ферментов, а также задерживают окисление адреналина. В основе строения веществ Р-витаминного действия лежит ядро флавона. К ним относятся: рутин, эриодиктин, геспередин, кверцетин и др. Одним из наиболее активных соединений является рутин — гликозид флавонола кверцетина и дисахарида — рутинозы.

Кверцетин
(3,5,7,3',4',-пентаоксифлавон)

Катехин

Рутин

К группе веществ Р-витаминного действия относят также антоцианидины, например цианидин — агликон цианина, пигмента, широко распространенного в цветах и плодах некоторых высших растений. Витамин группы Р, выделенный из лимонов в кристаллическом виде, назван цитрином. Физиологически активными являются также катехины, содержащиеся в листьях чая.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА РУТИН И КВЕРЦЕТИН

Оборудование, реактивы. Пипетки с одной меткой на 1 и 2 мл (5 шт.); штатив лабораторный с пробирками; рутин (порошок и насыщенный водный раствор); кверцетин (насыщенный раствор в этиловом спирте); хлорид железа (III) (1%-ный); серная кислота (конц., ρ 1, 84 г/см^3); магний металлический (лента или порошок); соляная кислота (ρ 1,19 г/см^3); растворы для приготовления фелинговой жидкости (см. приложение); соляная кислота (0,5%-ная); гидроксид натрия (10%-ный).

Реакция с хлоридом железа (III)

Хлорид железа (III) образует с рутином комплексное соединение, окрашенное в изумрудно-зеленый цвет. Координационные связи возникают между ионом железа и атомами кислорода фенольных гидроксильных групп молекулы рутина.

К 1—2 мл насыщенного водного раствора рутина прибавляют несколько капель 1%-ного раствора хлорида железа (III). Возникает зеленое окрашивание.

Реакция с концентрированной серной кислотой

Концентрированная серная кислота образует с флавонами и флавонолами оксониевые (флавилиевые) соли, растворы которых характеризуются ярко-желтой окраской.

К 1—2 мл насыщенного водного раствора рутина осторожно по стенке пробирки добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты. На границе двух жидкостей возникает окрашенное в желтый цвет кольцо.

Реакция восстановления кверцетина

Кверцетин легко восстанавливается, образуя цианидин с красно-розовой или фиолетово-красной окраской (в зависимости от концентрации).

$$\text{Кверцетин} + Mg + 3HCl \longrightarrow [\text{Цианидин}]^{+}Cl^{-} + MgCl_2 + H_2O$$

Кверцетин *Цианидин*

К 1 мл насыщенного спиртового раствора кверцетина добавляют кусочек магниевой ленты или немного (на кончике скальпеля) порошка металлического магния и 3—4 капли концентрированной соляной кислоты. Жидкость вначале окрашивается в розовый цвет, но при стоянии интенсивность окраски усиливается до малиновой или фиолетово-красной.

Реакция рутина с фелинговой жидкостью

При кислотном гидролизе рутина вначале отщепляется молекула рутинозы, которая далее распадается на глюкозу и рамнозу, обладающие восстанавливающими свойствами.

К 0,5 г рутина добавляют 5 мл 0,5%-ного раствора соляной кислоты. Смесь доводят до кипения, кипятят в течение 1 мин, затем фильтруют. К 5 мл полученного фильтрата приливают 3 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и 3 мл фелинговой жидкости (готовится непосредственно перед употреблением; см. приложение) и снова нагревают до кипения. Выпадает красный осадок оксида меди (I).

ВИТАМИН Bc (ПТЕРОИЛГЛУТАМИНОВАЯ КИСЛОТА)

Этот витамин содержится в значительном количестве в листьях, поэтому он более известен под названием фолиевой кислоты (фолиум—лист). Сейчас выделено несколько фолиевых кислот, содержащих остатки птероевой и глутаминовой кислот (от 3 до 6). Фолиевая кислота выполняет важнейшие функции в обмене веществ, в частности, она переносит одноуглеродные фрагменты при биосинтезе многих соединений: аминокислот, пуриновых оснований и др.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ В МОЛОКЕ

Для количественного определения фолиевой кислоты ее адсорбируют из молока активированным углем. Затем ее окисляют перманганатом калия, в результате чего от нее отщепляются

парааминобензойная кислота, глутаминовая кислота и птеридин-6-карбоновая кислота (или альдегид), дающая интенсивно-голубую флюоресценцию с максимумом свечения при 470 нм.

Оборудование, реактивы. Флюорометр; термостат на 40°C; баня водяная; круглодонная колба (Вюрца); мерная колба на 25 мл; воронка фильтрующая № 2; колбы мерные на 100 мл (2 шт.); пипетки с одной меткой на 1 мл (2 шт.); цилиндры измерительные с носиком на 25 и 100 мл (4 шт.); свежее молоко; толуол; уголь активированный; пенициллиновая пленка — источник протеолитических ферментов (глубинный мицелий Penicillium высушивается ацетоном и хранится в склянке с притертой пробкой); серная кислота (2%-ная и 15%-ная); гидроксид натрия (15%-ный); аммиак (3%-ный) в этиловом спирте (70%-ном); перманганат калия (4%-ный); пероксид водорода (3%-ный); исходный стандартный раствор фолиевой кислоты (20 мг перекристаллизованной фолиевой кислоты растворяют в 100 мл воды, подщелоченной тремя каплями 10%-ного раствора гидроксида натрия; раствор хранят в холодильнике, в темной склянке под толуолом; перед анализом готовят рабочий стандартный раствор фолиевой кислоты, разводя исходный стандартный раствор в 100 раз; в 1 мл рабочего стандартного раствора содержится 2 мкг фолиевой кислоты).

В колбу наливают 35 мл молока, 45 мл воды и добавляют несколько капель 15%-ного раствора серной кислоты до pH 3,5—4,0. Содержимое колбы перемешивают, устанавливают обратный воздушный холодильник и нагревают на кипящей водяной бане в течение 45 мин. Затем жидкость в колбе охлаждают до 32°C и доводят ее pH до 4,5—5,0 15%-ным раствором гидроксида натрия. Далее в колбу вносят 200 мг пенициллиновой пленки, растворенной в 10 мл воды, 3 капли толуола, хорошо перемешивают содержимое и ферментируют 16—18 ч при 38—40°C. Через указанный промежуток времени колбу охлаждают до комнатной температуры, содержимое фильтруют через складчатый фильтр. Осадок на фильтре дважды промывают небольшими порциями воды. Объем полученного фильтрата доводят водой до 100 мл. В коническую колбу вносят 50 мл фильтрата, подкисляют его 15%-ным раствором серной кислоты до pH 3 и всыпают 100 мг активированного угля. Смесь кипятят 5 мин под тягой при помешивании, затем фильтруют через пористый стеклянный фильтр под вакуумом. Колбу Бунзена заменяют и через тот же фильтр 5 раз пропускают нагретый до кипения 3%-ный раствор аммиака в 70%-ном спирте для снятия фолиевой кислоты с угля (всего для элюции берут 70 мл жидкости; первый раз — 20 мл, второй и третий — по 15 мл; четвертый и пятый — по 10 мл). Объединенные элюаты перегоняют в колбе Вюрца до объема 10—15 мл. Остаток переносят в мерную колбу на 25 мл и подкисляют 2%-ным раствором серной кислоты до pH 3, после чего по каплям добавляют 4%-ный раствор перманганата калия до появления розовой окраски, не исчезающей в течение 10 мин. Далее для удаления избытка перманганата калия добавляют по каплям 3%-ный раствор пероксида водорода и доводят pH до 4,0—4,5 15%-ным раствором гидроксида натрия. Общий объем доводят водой до 25 мл. Жидкость фильтруют и измеряют интенсивность флюоресценции при 470 нм на флюоро-

метре марки ЭФ-3 М. Параллельно измеряют интенсивность флюоресценции стандартного раствора фолиевой кислоты, который обрабатывают тем же способом, что и испытуемый раствор (контрольный опыт), и стандартного раствора без обработки. Содержание фолиевой кислоты рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{(A - A_1) \cdot b \cdot V \cdot V_1}{A_2 \cdot a \cdot V_0},$$

где C — содержание фолиевой кислоты (в мкг/мл); A — показания флюорометра для испытуемого раствора; A_1 — показания флюорометра для контрольного раствора; A_2 — показания флюорометра для стандартного раствора фолиевой кислоты; b — содержание фолиевой кислоты в 1 мл стандартного раствора; a — масса молока (г); V — количество фильтрата, взятого для адсорбции (мл); V_1 — конечный объем раствора, взятого для определения (мл); V_0 — обьем гидролизата после разбавления водой (мл).

УГЛЕВОДЫ И ИХ ОБМЕН

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА УГЛЕВОДЫ

Оборудование, реактивы. Спектроскоп (карманный); пипетка с одной меткой на 2 мл; баллон резиновый; баня водяная; пробирки стеклянные химические; бюретка прямая с краном на 50 мл; пипетки градуированные на 1 и 5 мл; глюкоза; фруктоза, манноза; галактоза; рамноза; арабиноза; ксилоза; рибоза; дезоксирибоза; мальтоза; лактоза; сахароза; крахмал; гликоген; инулин; ДНК; N-ацетил-D-глюкозамин (0,1%-ные); α-нафтол (10%-ный спиртовой); нафторезорцин (1%-ный спиртовой); эфир; бензол: этанол; амиловый спирт; серная кислота (конц.); соляная кислота (конц.); гидроксид натрия (10%-ный); сульфат меди (5%-ный); тетраборат калия (0,8 М); хлорид натрия; фелингова жидкость; реактив Ниландера; реактив Барфеда; реактив Селиванова; орциновый реактив; раствор дифениламина; реактив Эрлиха; раствор Люголя (см. приложение); периодат натрия (0,25 М); этиленгликоль, перегнанный над гидроксидом натрия; гидроксид натрия (0,01 н.); метиловый красный.

Проводят качественные реакции на углеводы. Результаты этих реакций записывают в таблицу. Одновременно проделывают аналогичные реакции с двумя неизвестными (I и II, из перечня указанных в таблице) углеводами, природу которых требуется установить, используя качественные пробы. Сопоставляя соответствующие тесты для известных углеводов и испытуемых (I и II), делают заключение о природе последних. Для более убедительного доказательства можно использовать микрохимическое определение сахаров путем окисления периодатом (см. с. 223) в случае моносахаридов и тонкослойную хроматографию в случае моно- и дисахаридов (с. 237), что является заключительным экспериментом при решении этой задачи.

РЕАКЦИЯ ПОДОБЕДОВА — МОЛИША С α-НАФТОЛОМ

Чувствительной реакцией на углеводы является реакция с α-нафтолом. Испытуемое вещество в твердом виде или в растворе должно быть свободно от волокон фильтровальной бумаги.

В пробирку берут 1 мл испытуемого раствора или крупинку твердого вещества, растворенного в 1 мл воды. Добавляют 2 капли 10%-ного спиртового раствора α-нафтола и по стенке пробирки приливают осторожно, без встряхивания, 2 мл концентрирован-

Углевод	Реакция с α-нафтолом	Нафторезорциновая проба	Проба на редуцирующие сахара	Реакция Барфеда	Реакция Селиванова	Реакция Биаля	Реакция с дифениламином	Реакция Эльсона-Моргана	Реакция с иодом
Глюкоза									
Фруктоза									
Манноза									
Галактоза									
Рамноза									
Арабиноза									
Ксилоза									
Рибоза									
Дезоксирибоза									
Мальтоза									
Лактоза									
Сахароза									
Крахмал									
Гликоген									
Инулин									
N-ацетил-D-глюкозамин									
ДНК									
I									
II									

ной серной кислоты. Серная кислота опускается на дно пробирки, и на границе двух жидкостей образуется кольцо красно-фиолетового цвета. Фурфурол и 5-оксиметилфурфурол, образующиеся из углеводов под действием серной кислоты, конденсируясь с 2 моль сульфированного α-нафтола, дают триарилметановый хромоген, который окисляется серной кислотой в окрашенное хиноидное соединение.

НАФТОРЕЗОРЦИНОВАЯ ПРОБА ТОЛЛЕНСА

К 5—6 мл испытуемого раствора прибавляют 1 мл 1%-ного спиртового раствора нафторезорцина и такой же объем концентрированной соляной кислоты. Смесь осторожно нагревают до кипения и кипятят 1 мин. Затем охлаждают и взбалтывают с эфиром или бензолом.

Эфирный (бензольный) слой окрашивается в различные цвета: глюкоза, манноза, галактоза дают сине-зеленую окраску; рамноза — фиолетовую; арабиноза и ксилоза — темно-синюю; уроновые кислоты, для обнаружения которых часто применяется эта реакция, окрашивают эфирный (бензольный) слой в фиолетовый цвет.

ПРОБЫ НА РЕДУЦИРУЮЩИЕ САХАРА

Моносахариды, окисляясь в щелочной среде, восстанавливают соли оксида меди (II) в соли оксида меди (I), соли оксида висмута — до металлического висмута, соли серебра — до металлического серебра. Эти реакции используются для количественного определения так называемых восстанавливающих (редуцирующих) моносахаридов, молекула которых содержит карбонильную группу. Восстанавливающими свойствами обладают также некоторые дисахариды — мальтоза, лактоза и целлобиоза, молекулы которых имеют по одной свободной карбонильной группе. Окисление легко протекает в щелочной, труднее — в нейтральной и особенно трудно — в кислой средах.

Реакция Троммера

Моносахариды в щелочной среде восстанавливают оксид меди (II) в оксид меди (I), а сами окисляются до альдоновых кислот.

В пробирку наливают 1—2 мл раствора глюкозы и равный объем 10%-ного раствора гидроксида натрия. К смеси прибавляют при встряхивании по каплям 5%-ный раствор сульфата меди до появления неисчезающей мути гидроксида меди (II). Осторожно нагревают верхнюю часть содержимого пробирки. Появляется желтое окрашивание [гидроксид меди (I)], переходящее в красное [оксид меди (I)], что указывает на положительную реакцию Троммера:

$$\begin{array}{c} C{\overset{\displaystyle O}{\diagup\!\!\diagup}}\!\!\diagdown H \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ HO-C-H \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ CH_2OH \end{array} + 2CuSO_4 + 5NaOH \longrightarrow \begin{array}{c} C{\overset{\displaystyle O}{\diagup\!\!\diagup}}\!\!\diagdown ONa \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ HO-C-H \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ CH_2OH \end{array} + \underset{\displaystyle Cu_2O \quad H_2O}{\underline{2CuOH}} + 2Na_2SO_4 + 2H_2O$$

Проделывают реакцию Троммера с растворами мальтозы, сахарозы и крахмала. Избыток медной соли маскирует реакцию, так как гидроксид меди (II) при нагревании теряет воду и дает черный оксид меди (II).

Реакция с фелинговой жидкостью

Нередко пользуются так называемой фелинговой жидкостью, в которой ион меди в степени окисления +2 находится в виде комплексного соединения с тартратами. Механизм реакции редуцирующих углеводов с фелинговой жидкостью такой же, как и реакции Троммера. Преимуществом фелинговой жидкости является то, что медь при избытке реактива не выпадает в виде оксида меди (II).

К 1—2 мл раствора глюкозы приливают равный объем фелинговой жидкости и смесь нагревают до начинающегося кипения. Образуется красный осадок оксида меди (I):

$$\underset{D\text{-Глюкоза}}{\begin{matrix} C{\diagup\!\!\!\!=O \atop \diagdown H} \\ H-C-OH \\ HO-C-H \\ H-C-OH \\ H-C-OH \\ CH_2OH \end{matrix}} + \underset{\text{Na, K — Тартрат-комплексное соединение меди, окрашенное в глубокий синий цвет}}{{K_2^+ \atop {Na_2^+ \atop H_2^+}} \left[\begin{matrix} O & & & & O \\ \| & & & & \| \\ C-\bar{O} \rightarrow & & & \leftarrow \bar{O}-C \\ HC-O- & & Cu & & -O-CH \\ CH-\bar{O} \rightarrow & & & \leftarrow \bar{O}-CH \\ COO^- & & & & COO^- \end{matrix} \right]} + NaOH + H_2O \longrightarrow \underset{D\text{-Глюконат натрия}}{\begin{matrix} C{\diagup\!\!\!\!=O \atop \diagdown ONa} \\ H-C-OH \\ HO-C-H \\ H-C-OH \\ H-C-OH \\ CH_2OH \end{matrix}} + \underset{\text{Na, K-Тартрат}}{\begin{matrix} COONa \\ H-C-OH \\ H-C-OH \\ COOK \end{matrix}} + \underset{\text{Оксид меди (I)}}{Cu_2O}$$

Проделывают реакцию с фелинговой жидкостью с растворами мальтозы, сахарозы и крахмала.

Реакция Ниландера

Для обнаружения редуцирующих сахаров часто применяют также соли висмута (реакция Ниландера). Соли висмута особенно удобны для обнаружения сахара в моче, так как в отличие от солей меди они не восстанавливаются мочевой кислотой.

$$Bi(OH)_2NO_3 + NaOH \rightarrow Bi(OH)_3 + NaNO_3$$

$$3\ \begin{matrix} C{\diagup\!\!\!\!=O \atop \diagdown H} \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ HO-C-H \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ -C-OH \\ | \\ CH_2OH \end{matrix} + 2Bi(OH)_3 \rightarrow 3\ \begin{matrix} COOH \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ HO-C-H \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ CH_2OH \end{matrix} + 2Bi\downarrow + 3H_2O$$

К 1—2 мл раствора глюкозы прибавляют 0,5—1 мл реактива Ниландера и осторожно кипятят около 2 мин. Появляется сначала коричневое, а затем черное окрашивание от мелкого осадка металлического висмута.

Проделывают реакцию с растворами мальтозы, сахарозы, крахмала.

Реакция Барфеда (отличие восстанавливающих дисахаридов от моносахаридов)

Проба Барфеда отличается от всех предыдущих реакций восстановления того или иного реагента тем, что окисление сахара протекает не в щелочной среде, а в среде, близкой к нейтральной. В этих условиях редуцирующие дисахариды в противоположность моносахаридам практически не окисляются, что позволяет отличить их от моносахаридов.

К 5 мл реактива Барфеда прибавляют 1 мл раствора исследуемого сахара. Смесь нагревают на водяной бане в течение 10 мин. Моносахариды восстанавливают реактив до оксида меди (I), дисахариды реакции не дают. Следует избегать длительного кипячения, так как дисахариды в кислой среде могут гидролизоваться до моносахаридов, и в результате реакция Барфеда станет положительной.

РЕАКЦИЯ СЕЛИВАНОВА НА КЕТОЗЫ

При нагревании фруктозы (и других кетогексоз) с соляной кислотой образуется оксиметилфурфурол, который с резорцином образует соединение, окрашенное в вишнево-красный цвет:

Фруктоза $\xrightarrow[HCl]{-3H_2O}$ Оксиметилфурфурол $\xrightarrow{\text{резорцин}}$ *Продукт конденсации, окрашенный в вишнево-красный цвет*

Фруктоза *Оксиметилфурфурол*

Альдозы также дают эту реакцию, но реакция у них протекает медленнее и в особых условиях (температура и кислотность среды).

В две пробирки наливают по 3 мл реактива Селиванова, в одну из них прибавляют 3 капли раствора фруктозы, в другую — 3 капли раствора глюкозы. Обе пробирки помещают в водяную баню, нагретую до 80°C, и держат в ней 8 мин. За это время в пробирке с фруктозой появляется красное окрашивание.

РЕАКЦИЯ НА ПЕНТОЗЫ С ОРЦИНОМ (РЕАКЦИЯ БИАЛЯ)

Пентозы в кислой среде образуют фурфурол, который конденсируется с орцином в присутствии следов хлорида железа (III):

Пентоза $\xrightarrow[HCl]{-3H_2O}$ Фурфурол $\xrightarrow{\text{орцин}}$ Продукт конденсации, окрашенный в зеленый цвет

К 1 мл испытуемого раствора прибавляют равный объем орцинового реактива. Смесь нагревают на кипящей водяной бане в течение 20 мин. При наличии пентоз или метилпентоз появляется зеленое окрашивание раствора.

Зеленое окрашивание дают также уроновые кислоты, но только после более продолжительного нагревания. Чтобы отличить пентозы от метилпентоз при помощи этой реакции, исследуют спектр поглощения окрашенного раствора. Для этого его встряхивают с амиловым спиртом и окрашенный в зеленый цвет слой последнего исследуют в спектроскопе. В случае пентоз видно две полосы поглощения: широкая в области 670 нм и слабая в области 610 нм, в случае метилпентоз — одна в области 670 нм.

РЕАКЦИЯ ДЕЗОКСИПЕНТОЗ С ДИФЕНИЛАМИНОМ

2-дезоксипентозы при нагревании с кислотой в мягких условиях образуют фурфуриловый спирт, оксилевулиновый альдегид и родственные им хромогены, которые конденсируются с ароматическими аминами с образованием соединений, имеющих синюю окраску.

К 1 мл раствора дезоксирибозы или ДНК приливают 2 мл раствора дифениламина. Реакционную смесь нагревают 10 мин при 100°С. Развивается синяя окраска, устойчивая в течение нескольких часов.

РЕАКЦИЯ N-АЦЕТИЛ-D-ГЛЮКОЗАМИНА С РЕАКТИВОМ ЭРЛИХА (РЕАКЦИЯ ЭЛЬСОНА — МОРГАНА)

N-ацетил-D-глюкозамин при нагревании в щелочном растворе образует хромоген, который в кислом растворе дает с реактивом Эрлиха окрашенное в фиолетовый цвет соединение. В пробирку помещают 0,5 мл раствора N-ацетил-D-глюкозамина и добавляют 0,1 мл 0,8 М раствора тетрабората калия, нагревают 3 мин на кипящей водяной бане и охлаждают водопроводной водой. К раствору добавляют 3 мл реактива Эрлиха. Смесь выдерживают 20 мин при 36—38°С.

РЕАКЦИЯ КРАХМАЛА И ГЛИКОГЕНА С ИОДОМ

К 2—3 мл раствора крахмала прибавляют 1—2 капли раствора Люголя. Раствор окрашивается в синий цвет. Содержимое пробирки делят на 3 части: к первой части прибавляют 1—2 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия, ко второй — 2—3 мл этилового спирта; третью часть нагревают. Во всех случаях окраска исчезает, причем в третьей пробе окраска вновь появляется при охлаждении. Реакция основана на образовании нестойкого адсорбционного соединения иода с амилозой (см. учебник, с. 154).

В пробирку наливают 2—3 мл раствора гликогена, добавляют 1—2 капли раствора Люголя, перемешивают, появляется красно-бурое окрашивание. Окраска усиливается при добавлении нескольких кристалликов хлорида натрия, но исчезает при добавлении раствора гидроксида натрия или нагревании.

Различие в цвете комплексов иод-крахмала и иод-гликогена свидетельствует о различии структур крахмала и гликогена (см. учебник, с. 152).

МИКРОХИМИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРОВ ПУТЕМ ОКИСЛЕНИЯ ПЕРИОДАТОМ

Аналитическая ценность иодной кислоты заключается в том, что она количественно окисляет все вторичные карбинольные группы в молекуле сахара до муравьиной кислоты, которая определяется титрованием, а первичные карбинольные группы — до формальдегида, который может быть связан димедоном:

$$CHO{-}(CHOH)_4{-}CH_2OH + 5\overline{IO_4} \rightarrow$$

$$\rightarrow 5HCOOH + H{-}C\begin{matrix}{/\!\!/}O\\ \diagdown H\end{matrix} + 5\overline{IO_3}$$

Пентозы и метилпентозы образуют по 4 моль муравьиной кислоты; гексозы — 5 моль, фруктоза и сорбоза — по 3 моль.

В пробирку с пришлифованной пробкой помещают 0,2—3,0 мг сахара и растворяют его в 5 мл воды. К полученному раствору добавляют 1 мл 0,25 М раствора периодата натрия $NaIO_4$ (1 мл раствора $NaIO_4$ указанной концентрации окисляет 3,9 мг сахара), смесь нагревают в течение 30 мин на кипящей водяной бане. После охлаждения пробирки водой добавляют 0,2 мл этиленгликоля для разложения избытка периодата. Одновременно ставят контрольный опыт, в котором присутствуют все реагенты, кроме сахара. Раствор титруют 0,01 н. раствором гидроксида натрия, применяя в качестве индикатора метиловый красный.

ВЫДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ

ВЫДЕЛЕНИЕ ГЛИКОГЕНА ИЗ ДРОЖЖЕЙ

Гликоген (см. учебник, с. 154—155) служит резервным углеводом не только животных, но и многих других организмов, в частности дрожжей, где он накапливается до 30% в сухом веществе, если дрожжи растут на крепком растворе сахара.

Полагают, что в организме гликоген существует в двух формах: прочно связанной с белками и трудно извлекаемой из ткани и менее прочно связанной с белками и легко экстрагируемой горячей водой и разбавленными растворами трихлоруксусной кислоты.

Существует два метода выделения гликогена. Один из них заключается в том, что исследуемую ткань обрабатывают 30%-ным раствором гидроксида калия на кипящей водяной бане. При такой жесткой обработке ткани распадаются, большинство веществ гидролизуется, но гликоген не изменяется и при добавлении спирта выпадает в осадок, однако относительная молекулярная масса гликогена при такой обработке значительно уменьшается.

Другой метод сводится к извлечению гликогена 5%-ным раствором трихлоруксусной кислоты. Такая обработка меньше отражается на относительной молекулярной массе гликогена, но в этом случае трудно извлечь полностью гликоген, связанный с белком. Для получения нативного гликогена предпочтительнее пользоваться вторым методом.

Оборудование, реактивы. Термостат; центрифуга; шкаф сушильный; холодильник; колбы конические на 250 и 300 мл; ступка фарфоровая (диаметр 90 мм); цилиндр измерительный с носиком на 50 мл; стаканчики для взвешивания (бюксы); воронка Бюхнера; воронка стеклянная; палочка стеклянная; дрожжи пивные; сахароза (20%-ная); трихлоруксусная кислота (5%-ная и 10%-ная); песок кварцевый; этанол; диэтиловый эфир.

10 г пивных дрожжей, отмытых от сусла и отфильтрованных на воронке Бюхнера до плотного состояния, размешивают в 200 мл 20%-ного раствора сахарозы и оставляют при 25°С на 3 ч. Начинается интенсивное брожение, в процессе которого в дрожжевых клетках накапливается гликоген.

Затем процесс прерывают, дрожжи быстро отделяют центрифугированием и растирают в предварительно охлажденной ступке в течение 10 мин с 15 мл охлажденной до 0°С 10%-ной трихлоруксусной кислотой с добавлением 5 г кварцевого песка. Смесь центрифугируют 5 мин при 3000 *g*. Кислый экстракт сливают в коническую колбу на 200 мл и хранят при температуре 0—4°С, а осадок переносят в ступку и снова экстрагируют 10 мл охлажденной 5%-ной трихлоруксусной кислоты. Эту операцию повторяют трижды. Вместо центрифугирования остаток дрожжей можно отсасывать на воронке Бюхнера. Все экстракты собирают в коническую колбу и, если раствор содержит твердые частицы, фильтруют, а фильтр промывают двумя порциями по 3 мл 5%-ной трихлоруксусной ки-

слоты. При высоком содержании гликогена экстракт опалесцирует.

К экстракту прибавляют двойной объем этанола, перемешивают и оставляют при 0°С на 30 мин, после чего осадок (гликоген) отделяют центрифугированием при 3000 *g* в течение 5—10 мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок гликогена для его очистки растворяют в 3 объемах подогретой воды, размешивая его стеклянной палочкой. Затем приливают двойной объем (по отношению к взятой воде) спирта, оставляют на 30 мин в холодильнике, после чего центрифугируют. Осадок гликогена дважды промывают 5 мл 65%-ного раствора спирта, хорошо размешивая и каждый раз отделяя центрифугированием. После этого гликоген промывают 5 мл 96%-ного спирта и, наконец, 10 мл эфира. Гликоген количественно переносят во взвешенный бюкс, просушивают в сушильном шкафу при 80°С и взвешивают.

ВЫДЕЛЕНИЕ ГЛИКОГЕНА ИЗ ЖИВОТНЫХ ТКАНЕЙ

В организме высших животных гликогена больше всего в печени, значительно менее богата им мышечная ткань.

Оборудованне, реактивы. Центрифуга; холодильник; баня водяная; пробирка стекляиная хнмическая; трубка стеклянная; гидроксид калия (30%-ный); сульфат натрия (10%-ный); этанол.

300 мг выделенной из только что убитого животного ткани (печень, мышцы, мозг), грены, куколок или гусениц шелкопряда помещают в пробирку с 2 мл нагретого 30%-ного раствора гидроксида калия. Пробирку нагревают в течение 30—60 мин на кипящей водяной бане при частом перемешивании содержимого. По окончании гидролиза пробирку охлаждают и к ее содержимому прибавляют 0,2 мл 10%-ного раствора сульфата натрия и 5 мл этанола. Смесь хорошо перемешивают и оставляют на ночь в холодильнике. На следующий день образовавшийся осадок отделяют центрифугированием в течение 40 мин при 7000 *g*. Надосадочную жидкость отбрасывают, а осадок растворяют в 1—2 мл воды. К полученному раствору прибавляют 2 объема этанола, перемешивают и оставляют на 30 мин в холодильнике. Образовавшийся осадок отделяют центрифугированием, растворяют в воде и переосаждают спиртом. После третьего переосаждения гликогена надосадочную жидкость удаляют. Осадок гликогена высушивают, растворят в воде и используют для определения его концентрации с помощью химического или ферментативного метода (с. 238).

ОБНАРУЖЕНИЕ ГЛИКОГЕНА В ЖИВОТНЫХ ТКАНЯХ

Оборудованне, реактнвы. Центрифуга; баня водяная; пробиркн стеклянные центрифужные; стакан стекляиный лабораторный высокий без носика; пипеткн градуированные на 2 и 5 мл; лед; гидроксид калия (15%-ный и 60%-ный); соляная кислота (2,5%-ная); гидроксид натрия (10%-ный); этанол; фелингова жидкость; реактив Люголя (см. приложение).

В центрифужную пробирку наливают 2 мл 60%-ного раствора гидроксида калия; туда же помещают 1,5—2 г ткани. Пробирку ставят на 1 ч в кипящую водяную баню, содержимое пробирки часто взбалтывают. Затем пробирку вынимают из бани, охлаждают и добавляют в нее 8—10 мл этанола. Пробирку помещают в стакан со льдом на 20—30 мин. Выпадает осадок гликогена. Его отделяют центрифугированием в течение 5—10 мин при 3000 g. Жидкость сливают, а осадок растворяют в 2 мл 15%-ного раствора гидроксида калия, добавляют 8—10 мл этанола и охлаждают полученную смесь. Выпавший снова осадок гликогена отделяют центрифугированием. Растворяют небольшую часть осадка гликогена в нескольких каплях воды и добавляют реактив Люголя; появляется красное окрашивание, исчезающее при нагревании и снова появляющееся при охлаждении. Оставшуюся часть осадка гликогена гидролизуют и доказывают наличие в его составе глюкозы. Для этого добавляют к нему 3—4 мл 2,5%-ного раствора соляной кислоты и кипятят 15—20 мин. Охлаждают и нейтрализуют 10%-ным раствором гидроксида натрия, добавляют равный объем фелинговой жидкости. Смесь нагревают до начинающегося кипения. Образуется красный осадок оксида меди (I).

ВЫДЕЛЕНИЕ РАСТВОРИМЫХ УГЛЕВОДОВ ИЗ ЛИСТЬЕВ ШЕЛКОВИЦЫ И ИХ РАЗДЕЛЕНИЕ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ НА БУМАГЕ

Оборудование, реактивы. Центрифуга; шкаф сушильный; камера для проявления хроматограмм; эксикатор с краном; пульверизатор; воронка Бюхнера; микропипетки; ступка фарфоровая (диаметр 90 мм); чашка выпарительная; пипетки градуированные на 5 и 10 мл; баня водяная; воронка фильтрующая; колба коническая на 50 мл с притертым холодильником; бумага хроматографическая быстро впитывающая; этанол (75%-ный); изопропанол (10%-ный); соляная кислота (конц.); гидрокарбонат натрия; смесь н-бутанола, уксусной кислоты и воды (4 : 1 : 1); бензидиновый проявитель (см. приложение); стандартный раствор смеси сахаров (см. ниже); реактивы и оборудование для определения сахаров по Хагедорну — Иенсену (с. 231).

Э к с т р а к ц и ю у г л е в о д о в для последующего хроматографического определения ведут из навески (1 г) тонко измельченных воздушно-сухих листьев, взятой на аналитических весах. Навеску растирают в фарфоровой ступке с 10 мл 75%-ного этанола в течение 30 мин, содержимое ступки переносят на воронку Бюхнера и фильтруют через двойной плотный фильтр марки «Синяя лента». Осадок на фильтре промывают тремя порциями (по 2 мл) 75%-ного этанола. Фильтр с осадком подсушивают при комнатной температуре на воронке Бюхнера в течение 30 мин, снимают осадок с фильтра и подвергают новой экстракции. Эту процедуру повторяют трижды. Спиртовые экстракты объединяют, помещают в выпарительную чашку и высушивают в эксикаторе с краном. Полученный осадок суспендируют с 2 мл 10%-ного изопропанола и центрифугируют при 11 000 g в течение 20 мин для удаления пиг-

ментов. Надосадочную жидкость, содержащую углеводы, осторожно переносят во взвешенную выпаривательную чашку, осадок дважды промывают двумя порциями по 2 мл 10%-ного изопропанола, отбивая его каждый раз на центрифуге при 11 000 *g*. Промывные воды присоединяют к первой порции надосадочной жидкости и сушат досуха в эксикаторе с краном. Выпаривательную чашку взвешивают и осадок растворяют в 1 мл 10%-ного изопропанола, взятого с точностью до 10^{-4} г.

Разделение углеводов, содержащихся в полученном экстракте, ведут методом хроматографии распределения на быстровпитывающей хроматографической бумаге. Параллельно более короткой стороне половины стандартного листа хроматографической бумаги (32×58 см) на расстоянии 7 см от нее проводят мягким графитовым карандашом линию старта. Отступя от края 2 см, на линии старта отмечают шесть полос шириной по 3,5 см с промежутками между ними в 2,5 см. Четыре первые полосы (1, 2, 3, 4) отводятся для испытуемых растворов: первая и четвертая полосы — для качественного, вторая и третья — для количественного определения углеводов; пятая — для стандартного раствора и шестая — не используется (участки бумаги с этой части хроматограммы служат для контроля). Растворы (около 0,05 г) наносят с помощью микропипеток по массе (с точностью 10^{-4} г). Исходные растворы сахаров для получения рабочего стандартного раствора готовят 0,06 *М* и смешивают в равных объемах. Хроматограммы проявляют смесью н-бутанола, уксусной кислоты и воды (4 : 1 : 1) многократно: первый раз — в течение времени, в полтора раза превышающего таковое для полного пропитывания бумаги, в последующем — в течение времени, необходимого для пробега проявителя до нижнего края бумаги. После каждого проявления бумагу просушивают в токе воздуха в вытяжном шкафу и снова пропускают проявитель. По окончании проявления бумагу тщательно высушивают и разрезают на четыре части: первую полосу отдельно, вторую и третью вместе, четвертую и пятую вместе и шестую. Первую и третью части хроматограммы для обнаружения позиций сахаров опрыскивают из пульверизатора раствором бензидина, который реагирует со всеми восстанавливающими углеводами, а также с сахарозой, образуя окрашенные в коричневый цвет соединения. После опрыскивания бензидиновым реактивом и подсушивания хроматограммы прогревают в сушильном шкафу при 100—105°С 5—10 мин. Идентификацию сахаров проводят по положению углеводов-метчиков. Расположение углеводов на полосе со стандартным раствором при проявлении смесью бутанол — уксусная кислота — вода, начиная от линии старта, следующее: лактоза, мальтоза, сахароза, галактоза, глюкоза, манноза, арабиноза, фруктоза, ксилоза, рамноза. В этих условиях плохо разделяются манноза и арабиноза.

После обнаружения позиций сахаров все четыре части хроматограммы складывают вместе, как они были расположены ранее, и

на второй и третьей полосах очерчивают карандашом позиции сахаров, руководствуясь их положением на первой и четвертой полосках. Полученные прямоугольники размером приблизительно 3×4 см вырезают и элюируют с них сахара водой. На шестой, чистой полосе против каждого определяемого сахара также вычерчивают и вырезают из нее такой же величины прямоугольники, элюаты с которых используют для холостого опыта.

Элюцию углеводов с участков бумаги, содержащих индивидуальные сахара, ведут 12 мл воды. Бумагу разрезают на мелкие кусочки, элюцию проводят в течение 1 ч в колбах на 50 мл с притертыми холодильниками на водяной бане при температуре 70°С или в колбах, закрытых пробками, в сушильном шкафу при той же температуре и периодическом перемешивании. После охлаждения раствор фильтруют через фильтрующую воронку и отбирают 10 мл для анализа.

Количественное определение углеводов в элюатах осуществляют по методу Хагедорна — Иенсена (с. 231). Взятые из элюата 10 мл раствора сахара подвергают анализу (по Хагедорну) целиком. Элюат, полученный со свободной от сахаров полосы бумаги, используют как контроль, применяемый в методе Хагедорна при титровании любого раствора. Если в испытуемой пробе есть сахароза, ее гидролизуют. Для этого к 10 мл элюата добавляют 0,6 мл концентрированной соляной кислоты (ρ 1,19 г/см³) и полученную смесь нагревают в водяной бане при 70°С в течение 10 мин, после чего охлаждают ее под краном и нейтрализуют сухим гидрокарбонатом натрия.

Содержание сахара рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{m \cdot 12 \cdot p \cdot 10}{m_1 \cdot a},$$

где C — содержание сахара (в мг %) в воздушно-сухом материале; m — число миллиграмм сахара, найденного по методу Хагедорна в 10 мл элюата; 12 — общий объем элюата (в мл); m_1 — масса раствора сахара, нанесенного на хроматограмму (в г); p — масса спиртового экстракта углеводов (в г); a — навеска исследуемого вещества, взятая в анализ (в г).

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ

Пектиновые вещества — высокомолекулярные соединения, широко распространенные в растениях. Относительная молекулярная масса пектиновых веществ колеблется от 50 000 до 300 000. Они являются цементирующими соединениями, своего рода клеем, скрепляющим растительные клетки; благодаря своим гидрофильным свойствам предохраняют растения от высыхания, положительно влияют на засухоустойчивость и обеспечивают тургор.

Главная составная часть пектиновых веществ — полигалактуроновая, или пектовая, кислота:

Метилированная по карбоксильной группе полигалактуроновая кислота называется пектиновой кислотой или растворимым пектином. Характерным свойством пектина является его способность давать студни в присутствии кислоты и сахара. Это свойство широко используется в кондитерской промышленности.

Оборудование, реактивы. Шкаф сушильный; центрифуга; баня водяная; пипетка с одной меткой на 25 мл; колбы мерные на 250 и 500 мл; ступка фарфоровая (диаметр 90 мм); колба коническая на 500 мл с притертым холодильником; стаканчик для взвешивания (бюкс); уксусная кислота (1 н.); гидроксид натрия (0,1 н.); хлорид кальция (2 н.); нитрат серебра (1%-ный); песок кварцевый.

Выделение растворимого пектина

25 г свежего материала (яблоки, сахарная свекла) растирают с битым стеклом или кварцевым песком в фарфоровой ступке до однородной массы, переносят в коническую колбу на 500 мл, заливают 100 мл воды, нагретой до 45°С (не выше), и выдерживают (при периодическом взбалтывании) 30 мин при этой же температуре на водяной бане. Затем колбу плотно закрывают каучуковой пробкой и энергично взбалтывают 15—20 мин. После этого содержимое колбы центрифугируют при 3000 *g* в течение 10—15 мин и собирают прозрачный раствор пектина. Для обеспечения полноты извлечения растворимого пектина осадок повторно заливают 75 мл воды и получают второй экстракт; в третий раз заливают 50—60 мл воды, каждый раз отделяя растворимый пектин от осадка центрифугированием. Экстракты объединяют, доводя их общий объем до 250 мл. Растворимый пектин определяют пектатным методом (см. ниже).

Определение количества растворимого пектина по пектату кальция

Для количественного определения пектина часто пользуются методом, основанным на гидролизе пектиновых веществ и осаждении полигалактуроновой кислоты в виде пектата кальция.

В коническую колбу или химический стакан емкостью 500 мл отмеряют пипеткой 25 мл раствора пектина (см. выше) и приливают 100 мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия. Оставляют на 30 мин

для омыления растворимого пектина, который переходит в натриевую соль пектиновой кислоты. Затем добавляют 50 мл 1 н. раствора уксусной кислоты и получают свободную пектиновую (полигалактуроновую) кислоту. К полученной таким образом пектиновой кислоте через 5 мин прибавляют 50 мл 2 н. раствора хлорида кальция и оставляют стоять 1 ч. За это время выпадает осадок пектата кальция. Осадок промывают горячей водой на взвешенном фильтре (фильтр предварительно многократно промывают водой и высушивают до постоянной массы в сушильном шкафу при 100°С) до тех пор, пока не станет отрицательной реакция на хлорид-ион с 1%-ным раствором нитрата серебра. Осадок вместе с фильтром помещают в бюкс и доводят до постоянной массы в сушильном шкафу при 100°С. По разнице между первоначальной массой фильтра и массой его с пектатом кальция находят содержание последнего в 25 мл раствора пектата. Содержание пектиновой кислоты вычисляют по формуле:

$$C = \frac{x \cdot V \cdot 92}{a \cdot V_1},$$

где C — содержание пектиновой кислоты (в %); x — количество найденного пектата кальция (в г); a — навеска исследуемого растительного материала (в г); V_1 — объем фильтрата, взятого для омыления и осаждения в нем пектата кальция (в мл); V — начальный объем раствора пектина (в мл); 92 — коэффициент пересчета (в %), вычисленный исходя из того, что пектат кальция содержит 8% кальция.

Качественное обнаружение пектиновых веществ (реакция Эрлиха)

Оборудование, реактивы. Баня водяная; баня масляная; воронка Бюхнера; чашка выпарнвательная; колба коническая с притертым холодильником; серная кислота (1%-ная); карбонат бария; уголь животный; этанол; ацетат свинца.

3 г растительного материала нагревают в течение 30 мин с 10—20 объемами 1%-ного раствора серной кислоты в колбе с притертым холодильником при 145°С на масляной бане. Затем гидролизат смешивают с избыточным количеством карбоната бария и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин. Осадки сульфата бария и карбоната бария отфильтровывают и фильтрат упаривают. Раствор обрабатывают животным углем, фильтруют и смешивают с тремя объемами этилового спирта. Полученный хлопьевидный осадок отфильтровывают, растворяют в воде и смешивают с избытком ацетата свинца. Нагревание на водяной бане при наличии галактуроновой кислоты дает кирпично-красный осадок.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ

МИКРОМЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ ПО ХАГЕДОРНУ — ИЕНСЕНУ

Этот метод был предложен для количественного определения глюкозы в крови. Однако он не специфичен и может быть использован также для определения других моносахаридов (и некоторых дисахаридов), хотя в этом случае требуется введение некоторых поправок при расчетах.

Метод основан на реакции окисления глюкозы (и других углеводов) гексациано-(III) ферратом калия в слабощелочной среде при определенных условиях, которые должны каждый раз точно соблюдаться для получения воспроизводимых результатов:

$$2K_3[Fe(CN)_6]+C_6H_{12}O_6+3Na_2CO_3+H_2O\rightarrow$$
$$\rightarrow 2K_3Na[Fe(CN)_6]+C_5H_{11}O_5COONa+3NaHCO_3$$

Глюкоза окисляется до глюконовой кислоты, гексациано-(III) феррат калия восстанавливается до гексациано-(II) феррата. Гексациано-(III) феррат калия берут в избытке и неиспользованный остаток его определяют иодометрически в кислой среде:

$$2K_3[Fe(CN)_6]+2KI\overset{H^+}{\rightleftarrows}2K_4[Fe(CN)_6]+I_2$$

Вследствие обратимости этой реакции гексациано-(II) феррат калия переводят в нерастворимую соль $K_2Zn_3[Fe(CN)_6]_2$ действием сульфата цинка.

Образовавшийся в результате реакции свободный иод оттитровывают тиосульфатом натрия:

$$2Na_2S_2O_3+I_2\rightarrow Na_2S_4O_6+2NaI$$

Оборудование, реактивы. Микробюретка на 2 мл; колбы плоскодонные на 50 мл; воронки стеклянные; баня водяная; пипетки с одной меткой на 1, 2 и 5 мл; пробирки стеклянные химические; сульфат цинка (45%-ный, перед употреблением разбавляют в 100 раз); гидроксид натрия (0,1 н.); вата гигроскопическая (см. приложение); щелочной раствор гексациано-(III) феррата калия (1,65 г $K_3[Fe(CN)_6]$ и 10,6 г безводного карбоната натрия растворяют в воде в мерной колбе на 1 л и по растворении доливают до метки водой); реактив А (10 г сульфата цинка (без железа) и 50 г хлорида натрия растворяют в воде и доводят водой до 200 мл); реактив Б (перед употреблением к 40 мл реактива А добавляют 1 г иодида калия, не содержащего свободного иода); уксусная кислота (3%-ная, не содержащая железа; крахмал (1%-ный; см. приложение); тиосульфат натрия (0,005 н.); иодид калия (0,005 н., для установки титра тиосульфата).

Во взятой пробе не должно быть больше 0,385 мг глюкозы — это масса глюкозы, которая может быть окислена 2 мл 0,005 н. раствора гексациано-(III) феррата калия; объем крови или гемолимфы в пробе не должен превышать 0,1—0,2 мл. Пробу помещают в пробирку и для удаления белков приливают 1 мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия и 4 мл 0,45%-ного раствора сульфата

цинка. Перемешав раствор, пробирку погружают в кипящую водяную баню на 3 мин, после чего смесь фильтруют в коническую колбу на 50 мл через ватный тампон, вложенный в стеклянную воронку. Воронку и вату промывают горячей водой 3 раза по 2 мл, не наливая новой порции воды до полного стекания предыдущей. Обычно опыт ставят в двух повторностях и одновременно берут две контрольные пробы, в которые вместо исследуемого раствора приливают воду.

Во все пробы добавляют по 2 мл раствора гексациано-(III) феррата калия и ставят в кипящую водяную баню на 15 мин. Следует всегда соблюдать равенство объемов проб (10—12 мл) при окислении гексациано-(III) ферратом калия. После нагревания все пробы охлаждают до комнатной температуры, добавляют в каждую 3 мл реактива Б, 2 мл 3%-ного раствора уксусной кислоты и 5—6 капель 1%-ного раствора крахмала, а затем раствором тиосульфата титруют из микробюретки до обесцвечивания. Добавлять все реактивы следует перед самым титрованием.

Содержание глюкозы рассчитывают по специальной таблице (с. 233). При титровании определяется иод, соответствующий избытку гексациано-(III) феррата калия. Число миллилитров раствора тиосульфата, затраченное на реакцию с иодом, соответствует этому избытку. Чем меньше затрачено тиосульфата, тем, следовательно, было больше глюкозы в данной пробе. Таблица составлена так, что в ней определенному объему тиосульфата натрия, затраченному на титрование избытка гексациано-(III) феррата калия, соответствует то число миллиграммов глюкозы, которое вошло в реакцию.

Если на титрование в опыте пошло 1,12 мл тиосульфата, то по таблице это соответствует 0,155 мг глюкозы. Однако на титрование контрольной пробы всегда затрачивается некоторый объем тиосульфата, положим 1,95 мл, что соответствует 0,008 мг глюкозы. Это количество глюкозы следует отнять от количества глюкозы, найденного в опыте. Запись ведут следующим образом.

Опыт (среднее из двух измерений) 1,12 мл соответствует 0,155 мг глюкозы
Контроль . . . . 1,95 мл соответствует 0,008 мг глюкозы
Найдено в пробе . . . . 0,147 мг глюкозы

Если в анализ было взято 0,2 мл крови, то в 100 мл крови количество глюкозы равно:

$$C = \frac{0,147 \cdot 100}{0,2} = 73,5(\text{мг})$$

Необходимо, чтобы раствор гексациано-(III) феррата калия был строго 0,005 н. Но отвесить 1,6500 г гексациано-(III) феррата калия трудно. Поэтому берут несколько большую навеску и корректиру-

Таблица для вычисления содержания глюкозы по Хагедорну — Иенсену
(количество миллилитров 0,005 н. раствора тиосульфата и соответствующее им количество миллиграмм глюкозы при использовании 2 мл 0,005 н. раствора гексациано-(III) феррата калия)

Объем раствора тиосульфата (в мл)	Объем раствора тиосульфата (в мл)									
	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264	0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,141	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,097	0,095	0,093	0,092	0,090
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,020	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,007	0,005	0,003	0,002

ют ее разведением. Например, было отвешено 1,6543 г соли, этому количеству соответствует объем:

$$1{,}6500 : 1000 = 1{,}6543 : x; \quad x = 1002{,}6 \text{ мл}.$$

После того как соль будет растворена в мерной колбе на 1 л, следует добавить в нее из градуированной пипетки еще 2,6 мл воды.

ЭНЗИМАТИЧЕСКИЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ

Метод предназначен для специфического определения содержания глюкозы в биологических жидкостях после удаления белков в присутствии других сахаров и редуцирующих веществ не углеводной природы. Метод основан на каталитическом действии глюкозооксидазы (1.1.3.4), ускоряющей окисление β-D-глюкозы кислородом воздуха до глюконовой кислоты. Глюкозооксидаза (M_r 152 000) относится к флавопротеидам. При окислении глюкозы в ее присутствии образуется пероксид водорода в эквимолярном количестве:

$$C_6H_{12}O_6 + H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{глюкозооксидаза}} C_6H_{12}O_7 + H_2O_2$$

Пероксид водорода разлагается пероксидазой, а выделившийся атомарный кислород окисляет добавленный к реакционной смеси хромогенный кислородный акцептор. В качестве такового применяют *о*-толидин. Количественное определение глюкозы сводится к измерению экстинкции образовавшегося в опыте красителя и сравнению ее с таковой при использовании стандартного раствора глюкозы. Прямая зависимость между содержанием глюкозы и интенсивностью окраски сохраняется в пределах от 20 до 400 мг%.

Оборудование, реактивы. Фотоэлектроколориметр; центрифуга; секундомер; пипетки градуированные на 1 и 3 мл; пробирки стеклянные химические; пробирки стеклянные центрифужные; сульфат цинка (5%-ный): гидроксид натрия (0,3 н.); хлорид натрия (0,9%-ный); *о*-толидин (1%-ный), перекристаллизованный в абсолютном этаноле; ацетатный буфер (0,25 н.), pH 4,8 (4 части уксусной кислоты (0,25 н.) смешивают с 6 частями ацетата натрия (0,25 н.); стандартные растворы глюкозы (50, 100 и 200 мкг/мл), приготовленные на насыщенном водном растворе бензойной кислоты; рабочий реактив (см. приложение).

Осаждают белок из анализируемой крови, гемолимфы или иной биологической жидкости. С этой целью в центрифужной пробирке смешивают 0,4 мл 5%-ного раствора сульфата цинка, 0,4 мл 0,3 н. раствора гидроксида натрия и 1,1 мл 0,9%-ного раствора хлорида натрия, а затем добавляют 0,1 мл биологической жидкости. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и центрифугируют при 5000 *g* в течение 10—15 мин. Для определения глюкозы из центрифужной пробирки отбирают 1 мл надосадочной жидкости и переносят его в пробирку. Если метод используют для определения содержания гликогена и крахмала, то указанные полисахариды подвергают кислотному или ферментативному гид-

ролизу до полного превращения их в глюкозу. Для определения содержания глюкозы в этом случае берут 1 мл нейтрализованного гидролизата с содержанием глюкозы не более 200 мкг в 1 мл.

К пробам, содержащим по 1 мл исследуемых образцов, приливают по 3 мл рабочего реактива для определения глюкозы. Одновременно в аналогичные пробирки, содержащие по 1 мл раствора глюкозы (50, 100, 200 мкг/мл), и в две контрольные пробирки, содержащие по 1 мл воды, также приливают по 3 мл рабочего реактива. Прибавление рабочего реактива в каждую пробирку проводят в определенной последовательности с точным интервалом в 2 мин. Эту последовательность следует соблюдать и при измерении оптической плотности растворов.

В ходе реакции развивается окраска, интенсивность которой постепенно возрастает и достигает своего максимума при комнатной температуре через 10—15 мин после прибавления рабочего реактива (в зависимости от активности препарата глюкозооксидазы). Поэтому предварительно определяют время, необходимое для развития максимальной синей окраски по одному из стандартных растворов глюкозы. Для этого через 5 мин после прибавления рабочего раствора каждые 2 мин измеряют интенсивность окраски стандартного раствора глюкозы на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром (кювета шириной 5 мм). Сначала интенсивность окраски увеличивается, далее остается неизменной в течение нескольких минут, а затем начинает медленно уменьшаться. В соответствии с полученными данными принимают время развития окраски во всех остальных пробах. Кроме того, на основании полученных величин оптической плотности (экстинкции) для всех стандартных растворов глюкозы строят стандартную кривую. Количество глюкозы в исследуемых пробах рассчитывают по этой стандартной кривой. Для пересчета на содержание гликогена полученное количество глюкозы умножают на коэффициент 0,9 (с. 239).

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФРУКТОЗЫ

Определение фруктозы основано на реакции Селиванова (с. 221). Хотя эту реакцию дают также и альдогексозы (например, глюкоза), скорость образования оксиметилфурфурола из фруктозы при определенных условиях во много раз больше, что и обусловливает специфичность этой реакции для фруктозы.

Оборудование, реактивы. Фотоэлектроколориметр; баня водяная; пробирки с пришлифованным воздушным обратным холодильником (2 шт.); колбы мерные на 100 и 500 мл; пипетки с одной меткой на 2 и 5 мл; пипетка градуированная на 10 мл; резорцин (0,1%-ный) в этаноле (95%-ном); соляная кислота (30%-ная); стандартный раствор фруктозы (0,25 г фруктозы, взятой с точностью 10^{-4} г, растворяют в 100 мл воды в мерной колбе).

К 2 мл испытуемой пробы в пробирке с пришлифованным обратным воздушным холодильником добавляют 2 мл раствора резорцина и 6 мл 30%-ного раствора соляной кислоты, перемешивают и

нагревают 8 мин на водяной бане при 80°С. Одновременно с опытом ставят контроль. Для этого берут пипеткой 5 мл стандартного раствора фруктозы в мерную колбу на 500 мл и доливают водой до метки. К 2 мл этого раствора, содержащего 50 мкг фруктозы, прибавляют далее все остальные реактивы, как в опытной пробе. После нагревания растворы охлаждают и колориметрируют с фильтром, характеризующимся максимумом пропускания при 490 нм. Экстинкцию измеряют против реактивов, заменяя фруктозу 2 мл воды. Содержание фруктозы в пробе, взятой в анализ, вычисляют по формуле (в мкг):

$$C = \frac{a \cdot E}{E_1},$$

где a — количество фруктозы в пробе стандартного раствора (в мкг); E — экстинкция исследуемого раствора; E_1 — экстинкция стандартного раствора.

Этим методом можно определять также фосфорные эфиры фруктозы: фруктозо-1,6-дифосфат и фруктозо-6-фосфат. Ход анализа таков же, как и для свободной фруктозы. В качестве стандарта можно пользоваться свободной фруктозой, но в этом случае, чтобы вычислить содержание того и другого эфира, необходимо найденное количество фруктозы умножить на поправку: для фруктозо-1,6-дифосфата — 3,6, для фруктозо-6-фосфата — 2,39. Поправка возникает из-за того, что в составе фруктозо-1,6-дифосфата на долю фруктозы приходится 53% и интенсивность ее цветной реакции равна 52,5% от той, которая есть у эквимолекулярного количества свободной фруктозы. Поэтому найденное количество C нужно умножить на фактор $\frac{100 \cdot 100}{53 \cdot 52,5} = 3,6$ в случае фруктозо-1,6-дифосфата и на фактор $\frac{100 \cdot 100}{60,5 \cdot 69,2} = 2,39$ в случае фруктозо-6-фосфата.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕНТОЗЫ (ПО МЕЙБАУМ)

Определение по Мейбаум основано на измерении экстинкции окрашенного в зеленый цвет соединения, возникающего при взаимодействии пентозы с орцином (с. 222).

Оборудоваиие, реактивы. Фотоэлектроколориметр; колбы мериые иа 200 и 500 мл; пипетки градуироваииые на 3 и 5 мл; пробнрки с притертыми обратными холодильиикамн; орциновый реактив (см. приложение); исходиый стандартиый водиый раствор рибозы или арабииозы (0,2 г в 200 мл).

В пробирку, снабженную обратным воздушным холодильником, вносят пипеткой 3 мл испытуемого раствора и прибавляют 3 мл орцинового реактива. Одновременно готовят разбавленный стандартный раствор арабинозы или рибозы. Для этого в мерную колбу на 500 мл берут пипеткой 5 мл исходного раствора пентозы (0,2 г в 200 мл раствора) и доводят водой до метки. Из этого раство-

ра пипеткой берут 3 мл (в этом объеме содержится 30 мкг пентозы) в пробирку, снабженную обратным холодильником, и прибавляют 3 мл орцинового реактива. Обе пробирки ставят в кипящую водяную баню на 20 мин, охлаждают и фотометрируют с фильтром 660 нм против реактивов (вместо пентозы или испытуемого раствора берут 3 мл дистиллированной воды). По этому методу пентозу определяют в составе фосфорных эфиров, моно-, ди- и трифосфатах нуклеозидов, никотинамидадениндинуклеотиде (в этом соединении определяется только 50% содержащейся в нем пентозы). Расчет содержания пентозы ведут, как при определении фруктозы (с. 236).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРОВ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Разделение углеводов методом тонкослойной хроматографии может быть осуществлено на таких сорбентах, как силикагель, оксид алюминия, целлюлоза.

Оборудование, реактивы. Шкаф сушильный; гомогенизатор; камера для хроматографирования; ступка фарфоровая (диаметр 90 мм); пластинки стеклянные (4,5×6 см); пипетка на 10 мл; пульверизатор; капилляры стеклянные; глюкоза; фруктоза; сахароза (1М); проявитель: бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 1); целлюлоза в порошке; анилинфталатный реактив (1,66 г фталиевой кислоты и 0,93 г свежеперегнанного анилина растворяют в 100 мл н-бутанола, насыщенного водой).

1 г целлюлозы насыпают в сухую фарфоровую ступку. При перемешивании добавляют 9 мл воды и растирают до однородной массы. Суспензию целлюлозы переносят в гомогенизатор и обрабатывают ее 2—3 мин при скорости вращения ножей гомогенизатора 3000 об/мин. Затем быстро с помощью пипетки на 10 мл наливают суспензию на один край пластинки и, наклоняя пластинку, равномерно распределяют всю суспензию на ее поверхности. Пластинку с сорбентом помещают на строго горизонтальную поверхность и сушат сначала на воздухе, а затем непосредственно перед работой в сушильном шкафу при 110°С в течение 10 мин. На расстоянии 1,0 см от узкого края пластинки карандашом или иглой намечают четыре едва заметные точки старта и наносят в них с помощью капиляров растворы сахаров в пределах от 50 до 250 мкг в каждом пятне. В одну точку наносят раствор глюкозы, в другую—фруктозы, в третью — сахарозы, а в четвертую — смесь указанных сахаров.

Пластинку с нанесенными растворами сахаров помещают в хроматографическую камеру, погружая ее стартовым краем в проявитель на 0,5 см. Через 60—90 мин хроматограмму вынимают, отмечают границу фронта проявителя, подсушивают и опрыскивают анилинфталатным реактивом, после чего выдерживают сначала на воздухе, а затем прогревают в сушильном шкафу при 130°С в тече-

ние 7—10 мин. Позиции углеводов на хроматограмме выявляются в виде коричневых пятен на светлом фоне. Определяют значения R_f для индивидуальных сахаров и идентифицируют их в смеси.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИКОГЕНА С ПОМОЩЬЮ АНТРОНОВОГО РЕАКТИВА

Для количественного определения гликогена наиболее часто используют химические методы определения с помощью антронового реактива или с применением фенола и серной кислоты. Оба метода позволяют определить гликоген без предварительного его гидролиза, что значительно экономит время.

При работе антроновым методом гексозы, дегидратируясь в присутствии концентрированной серной кислоты, конденсируются с антроном, давая соединение, окрашивающее раствор в синий цвет.

Антрон (9,10-дигидро-9-оксоантрацен)

Оборудование, реактивы. Фотоэлектроколориметр; баня водяная; пробирки стеклянные химические; пипетки градуированные на 0,5 и 5 мл; антрон перекристаллизованный (1 г антрона растворяют в 9 мл горячего бензола и к полученному раствору прибавляют 3 мл холодного петролейного эфира; выпавшие светло-желтые кристаллы отсасывают на воронке Бюхнера и высушивают в эксикаторе с краном над хлоридом кальция); серная кислота (66%-ная: к 34 мл воды осторожно приливают 66 мл концентрированной серной кислоты и охлаждают); тиомочевина; антроновый реактив (к 100 мл 66%-ной серной кислоты добавляют 1 г тиомочевины и 50 мг перекристаллизованного антрона, смесь помещают на водяную баню и нагревают при помешивании до 80—90°С, полученный прозрачный раствор охлаждают и хранят в холодильнике в темной склянке с притертой пробкой не более 2—3 недель); стандартные растворы глюкозы (50, 100 и 200 мг чистой глюкозы растворяют в 500 мл насыщенного раствора бензойной кислоты).

В пробирки наливают по 0,5 мл раствора, содержащего 20—200 мкг гликогена (испытуемая проба) и 50, 100 и 200 мкг глюкозы (для построения стандартной кривой). Для контроля на реактивы в две пробирки наливают по 0,5 мл воды. Во все пробирки приливают по 5 мл антронового реактива. Добавление реактива следует проводить быстро, так, чтобы струя реактива попадала в центр проб. Для этого используют пипетку с широким носиком. Смесь немедленно тщательно перемешивают и помещают на 10—15 мин в водяную баню комнатной температуры, а затем переносят в кипящую водяную баню на 15 мин. При нагревании следят, чтобы в пробирки не попала вода, которая мешает колориметрированию (раствор мутнеет). По окончании нагревания пробирки быстро

охлаждают в проточной воде и оставляют в темном месте на 30 мин. Окрашенные растворы колориметрируют на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром (620 нм) в кювете толщиной 0,5 см. Количество глюкозы в испытуемых пробах с гликогеном рассчитывают по стандартной кривой, которую строят для каждой серии определений. Для пересчета на содержание гликогена полученное количество глюкозы умножают на 0,9 (относительная молекулярная масса остатка глюкозы в гликогене равна 162,1, глюкозы $C_6H_{12}O_6$ — 180,1; 162,1 : 180,1 = 0,8999, или 0,9).

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРАХМАЛА

Химические методы определения крахмала основаны на измерении интенсивности его окраски с иодом, а также на определении количества образовавшейся глюкозы после его кислотного или ферментативного гидролиза. Метод, основанный на измерении интенсивности окраски крахмала с иодом, недостаточно точен в связи с тем, что взаимодействие это протекает различно у амилозы и амилопектина, а соотношение их в крахмале меняется в зависимости от объекта. Этот метод пригоден лишь для сравнительных определений. При использовании метода кислотного гидролиза необходимо количественное выделение крахмала из растительного материала, так как при кислотном гидролизе расщепляются наряду с крахмалом целлюлоза, гемицеллюлозы и другие полисахариды, которых в растениях довольно много. Наиболее достоверные результаты получают при ферментативном расщеплении крахмала амилазой слюны. Количество глюкозы, выделившейся при гидролизе крахмала, определяют иодометрически по Вильштеттеру и Шудлю.

Оборудование, реактивы. Баня водяная; колбы мерные на 200 мл; колбы конические на 200 мл с обратным холодильником; ступки фарфоровые (диаметр 90 мм); пипетки градуированные на 5 и 10 мл; пипетки с одной меткой на 25 мл; бюретки прямые с краном на 25 и 50 мл; цилиндр измерительный с носиком на 100 мл; пластинка стеклянная; палочка стеклянная; соляная кислота (25%-ная); хлорид натрия (10%-ный); иод (0,1 н.); тиосульфат натрия (0,1 н., точно установленный); гидроксид натрия (0,5 н.); серная кислота (2 н.); крахмал-индикатор (1%-ный; см. приложение); реактив Люголя (см. приложение).

5 г картофеля тщательно растирают в фарфоровой ступке, переносят в мерную колбу на 200 мл малым количеством холодной дистиллированной воды (30—50 мл) и туда же быстро вливают горячую дистиллированную воду (100 мл). Колбу сразу же помещают в кипящую водяную баню на 1 ч, чтобы полностью перевести крахмал в раствор. Содержимое колбы периодически перемешивают, при этом крахмальные зерна набухают и распадаются. Через 1 ч вынимают колбу из бани, охлаждают до 40°C и прибавляют 10 мл раствора слюны (приготовление раствора слюны см. с. 130). Так как амилаза активируется хлорид-ионами, то в колбу добавляют 5 мл 10%-ного раствора хлорида натрия. Ферментативный гидро-

лиз ведут при температуре 37—40°С в водяной бане в течение 2—3 ч при работе с крахмалом из клубней картофеля и 12—18 ч — из зерен злаковых растений. Степень гидролиза крахмала и момент его завершения устанавливают по реакции крахмала с иодом. Для этого стеклянной палочкой из колбы достают каплю жидкости с твердыми частицами, переносят пробу на стеклянную пластинку и приливают несколько капель раствора Люголя. Если при действии иода на пробу синего окрашивания не отмечается, колбу доводят водой до метки, тщательно перемешивают содержимое и фильтруют через сухой фильтр в сухой стакан или колбу.

Образовавшиеся в результате действия амилазы декстрины и мальтозу гидролизуют 2,5%-ной соляной кислотой. Для этого берут 100 мл фильтрата и переносят его в коническую колбу емкостью 200 мл. Добавляют туда же 12 мл 25%-ной соляной кислоты и выдерживают колбу на кипящей водяной бане с обратным холодильником (стеклянная трубка длиной около 80 см) в течение 3 ч. По окончании гидролиза колбу охлаждают, раствор из конической колбы переносят в мерную колбу на 200 мл, споласкивая ее несколько раз водой, и доводят раствор в мерной колбе до метки. В нем определяют содержание глюкозы иодометрически: берут 10 мл раствора, добавляют 15 мл 0,1 н. раствора иода и затем медленно вливают при энергичном помешивании 25 мл 0,5 н. раствора гидроксида натрия до исчезновения окраски иода; через 10—15 мин в колбу прибавляют 5 мл 2 н. раствора серной кислоты и выделившийся иод титруют 0,1 н. раствором тиосульфата. Когда раствор станет соломенно-желтым, добавляют 1 мл (20—25 капель) на каждые 50 мл жидкости 1%-ного раствора крахмала. Параллельно ставят контрольный опыт, в котором вместо гидролизата берут такой же объем дистиллированной воды. Содержание крахмала (С) в продукте (в процентах) рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{(V - V_1) \cdot V_2 \cdot 0{,}009 \cdot 100 \cdot 0{,}9}{a \cdot V_3},$$

где V — количество 0,1 н. раствора тиосульфата, израсходованного на титрование в контроле (в мл); V_1 — количество 0,1 н. раствора тиосульфата, израсходованного на титрование в опыте (в мл); 0,009 — коэффициент пересчета результатов титрования на содержание глюкозы; a — навеска исследуемого материала; 0,9 — коэффициент пересчета глюкозы в крахмал (с. 239); V_2 — объем вытяжки из растительного материала (в данном случае 400 мл); V_3 — объем гидролизата, взятого для иодометрического определения глюкозы (10 мл).

В клубнях картофеля содержание сахара незначительно (0,1—0,2%), поэтому им можно пренебречь и все найденное содержание глюкозы пересчитывать на крахмал. В другом материале (незрелые яблоки, листья, стебли) содержание сахаров более значительно. Чтобы получить точные данные о содержании крахмала в этом случае, необходимо в отдельной навеске определить коли-

чество редуцирующих моно- и дисахаридов и полученную величину затем вычесть из результатов определения глюкозы, после чего провести пересчет ее на крахмал.

ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

РАЗЛИЧИЕ В ДЕЙСТВИИ α- И β-АМИЛАЗ НА КРАХМАЛ

При участии амилаз осуществляется гидролиз различных соединений: крахмала, гликогена, олигосахаридов и родственных им веществ, построенных из остатков α-D-глюкопиранозы и содержащих в молекулах 1,4 и 1,6-связи (см. учебник, с. 404—406).

Оборудование, реактивы. Центрифуга; термостат; баня водяная; ступка фарфоровая (диаметр 90 мм); воронка Бюхнера; колба коническая на 100—150 мл; пробирки стеклянные химические; стакан стеклянный лабораторный высокий без носика; пипетки градуированные на 1, 2 и 10 мл; индикатор универсальный; хлорид натрия (1%-ный); сульфат аммония; этанол, цитратный буфер, pH 5,6 (84 мл лимонной кислоты (0,1М) смешивают с 116 мл $Na_2HPO_2 \cdot 2H_2O$ (0,2М); соляная кислота (0,1 н., 2%-ная); Na_2HPO_4 (0,15 М); растворимый крахмал (2%-ный); сульфат меди (6%-ный)); реактив Люголя; фелингова жидкость; реактив Барфеда (см. приложение); лед.

Для выделения α- и β-амилаз используют муку, зерновки злаков. Проросшее зерно содержит значительно больше амилаз, в связи с чем для получения этих ферментов лучше использовать солод. При приготовлении солода зерновки злаков (пшеницы, ржи, ячменя) проращивают до ростков размером с зерновку, высушивают в термостате при температуре не выше 35°С и измельчают в тонкую муку. 100 г молотого солода тщательно экстрагируют 400 мл 1%-ного раствора хлорида натрия в течение 1—1,5 ч при температуре 30—35°С с периодическим встряхиванием. Экстракт отфильтровывают на воронке Бюхнера и на каждые 100 мл его прибавляют по 35 г тонкоизмельченного сульфата аммония. При таком насыщении раствора сульфатом аммония α- и β-амилазы выпадают в осадок. Осадку дают хорошо отстояться на холоду и затем отделяют его от раствора центрифугированием при 3000 *g* в течение 10—15 мин. Осадок, содержащий ферменты, растворяют в 20 мл воды.

α-амилазу выделяют из этого раствора, прогревая 10 мл его в конической колбе при 70°С в течение 15 мин (необходимо строго следить за температурой), после чего раствор охлаждают и используют для исследования активности α-амилазы. β-амилаза при указанной температуре инактивируется. Так как оптимум pH α-амилазы равен 5,5—5,8, то после охлаждения к раствору α-амилазы добавляют 10 мл цитратной буферной смеси, pH 5,6.

β-амилазу выделяют из солодовой вытяжки путем инактивирования α-амилазы в кислой среде. Ко второй половине (10 мл) водного раствора амилаз прибавляют 2 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты и 8 мл воды (общий объем равен 20 мл, pH 3,3) и оставляют

в ледяной бане на 15 мин. Затем к раствору β-амилазы приливают 4 мл 0,15 М раствора гидрофосфата натрия для того, чтобы довести pH до 6,0.

Выявление декстринирующей способности амилаз проводят качественной пробой с иодом. В два ряда пронумерованных пробирок (по шесть пробирок в каждом ряду), вносят по 5 мл 2%-ного раствора крахмала. Затем в каждую пробирку добавляют ферментный раствор и воду в количествах, указанных в приведенной ниже таблице, причем в пробирки первого ряда вносят раствор α-амилазы, в пробирки второго ряда — раствор β-амилазы.

Название веществ	Количество вещества (в мл) в пробирках					
	1	2	3	4	5	6
Ферментный раствор	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	0
Вода	3,8	3,6	3,4	3,2	3,0	4,0

Растворы в пробирках тщательно смешивают и ставят в водяную баню при 40°С на 10 мин. По истечении этого времени их охлаждают и в каждую пробирку добавляют 0,1 мл 20%-ного раствора соляной кислоты для прекращения ферментативного процесса. Для определения глубины гидролиза крахмала в каждую пробирку вносят по 1—2 капли раствора Люголя. По окраске с иодом выявляют декстринирующую способность амилаз и определяют степень расщепления крахмала двумя видами амилаз.

Осахаривающую способность амилаз определяют следующим образом. В две пробирки вносят по 5 мл 2%-ного раствора крахмала, прогревают в водяной бане при 40°С в течение 15 мин. Затем в первую пробирку приливают 1 мл раствора α-амилазы, во вторую — 1 мл раствора β-амилазы. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и снова ставят в водяную баню при 40°С на 30 мин. По истечении этого времени ферментативный гидролиз крахмала останавливают, нагревая обе пробирки до кипения. Растворы охлаждают до комнатной температуры и содержимое каждой пробирки делят на две части: с одной частью раствора проводят реакцию с фелинговой жидкостью, с другой — реакцию Барфеда.

На основании полученных данных делают вывод о различии в действии α- и β-амилаз.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФАТА В ПРОЦЕССЕ БРОЖЕНИЯ (ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ФРУКТОЗО-1, 6-ДИФОСФАТА ПО НЕЙБЕРГУ И КОБЕЛЬ)

Процесс гликогенолиза, один из важнейших процессов распада углеводов, протекающий в животном организме в анаэробных условиях, начинается с распада гликогена и заканчивается образованием молочной кислоты (CH_3—СНОН—СООН). У микро-

организмов (дрожжей) и у растений протекает в анаэробных же условиях весьма сходный с первым процесс спиртового брожения, заканчивающийся образованием этилового спирта и углекислого газа.

Оба процесса характеризуются тем, что они протекают с участием фосфорной кислоты или, правильнее, с участием кислых фосфатов, так как pH сохраняется в пределах 6,6—7,0. При этом образуются сложные эфиры (1- и 6-глюкозомонофосфаты), переходящие во фруктозо-6-фосфат и далее во фруктозо-1,6-дифосфат.

Образовавшийся в обоих случаях фруктозо-1,6-дифосфат далее разлагается на две триозы: диоксиацетонфосфат и глицеринальдегидфосфат.

Если дрожжи отравить толуолом, то у них происходит ингибирование фермента альдолазы, разлагающего фруктозо-1,6-дифосфат на две триозы. В результате этого будет непрерывно поглощаться фосфорная кислота из внесенного в реакционную смесь фосфатного буфера с образованием и накоплением фруктозо-1,6-дифосфата.

Оборудование, реактивы. Центрнфуга; термостат; экснкатор с краном; воронка Бюхнера; колба коническая на 200 мл; ступка фарфоровая (диаметр 110 мм); пипеткн градуированные на 1, 2 и 5 мл; вороика стеклянная; цилнндр нзмерительный с носиком на 25 мл; дрожжн пивиые; сахароза; гндрофосфат натрия; дигндрофосфат калня; аммнак (2,5%-иый н 25%-ный); трихлоруксусная кислота (25%-ная); гидроксид натрия (10 н.); магнезнальная смесь (см. прнложение); соляиая кнслота (1 н.); карбоиат бария; этанол; эфир днэтнловый; толуол; метнловый оранжевый (0,2%-ный); фенолфталеин (1%-иый).

Пивные дрожжи отмывают водопроводной водой от сусла до тех пор, пока вытекающая вода не станет бесцветной, после чего дрожжи отсасывают на воронке Бюхнера до плотного состояния. Дрожжи сохраняют свою активность в течение нескольких дней, если их поместить в холодильник. 10 г сахарозы растворяют в 50 мл воды при 40°С, затем добавляют 3 г $Na_2HPO_2 \cdot 2H_2O$ и 1 г KH_2PO_4 (pH смеси около 7). После растворения солей в колбу вносят 15 г дрожжей, предварительно растертых в ступке с теплой водой (5—10 мл) в однородную массу. Смесь хорошо размешивают и ставят в термостат при 37°С на 15 мин, после чего к смеси добавляют 2—3 мл толуола, хорошо перемешивают для насыщения толуолом всей смеси и ставят снова в термостат. В течение первых 30 мин смесь несколько раз перемешивают.

Главной задачей во время работы является наблюдение за ходом фосфорилирования по убыли неорганического фосфата. С этой целью через 30 мин после начала брожения с интервалами вначале 30 мин, а затем 15 мин берут пробы по 1 мл, добавляют к ним по 2 мл 2,5%-ного раствора аммиака, осадок отфильтровывают через маленький влажный фильтр и к 2 мл прозрачного фильтрата прибавляют по 3 мл магнезиальной смеси. При наличии неорганического фосфата выпадает белый кристаллический осадок $MgNH_4PO_4$.

Для выявления динамики фосфорилирования пробирки с осадками сохраняют и по объему осадков в них судят о ходе фосфорилирования. После 2—2,5 ч работы осадок $MgNH_4PO_4$ перестает выделяться или перестает обнаруживаться дальнейшая убыль осадка. По достижении этого состояния брожение прекращают добавлением 25%-ного раствора трихлоруксусной кислоты до конечной ее концентрации 5%. Смесь взбалтывают и через 20—30 мин осадок белков отсасывают на воронке Бюхнера. Вместо фильтрования можно отделить осадок центрифугированием в течение 15 мин при 4000 *g*. Если надосадочная жидкость будет мутной, ее фильтруют через плотный влажный фильтр.

Выделение фруктозо-1,6-дифосфата начинают с осаждения фосфатов магнезиальной смесью. Для этого кислый фильтрат нейтрализуют по метиловому оранжевому 10 н. раствором гидроксида натрия, добавляют до резкого запаха 25%-ный раствор аммиака и 10 мл магнезиальной смеси. Смесь центрифугируют. Осадок отбрасывают, а к надосадочной жидкости прибавляют 2—3 капли 1%-ного раствора фенолфталеина и, смотря по окраске раствора, доводят его соляной кислотой или щелочью до pH 8,2 (слабо-розовая окраска). После этого добавляют 4 г карбоната бария, растворенного в 10—12 мл воды. Выпадает осадок бариевой соли фруктозо-1,6-дифосфата. Смесь центрифугируют, осадок промывают водой, затем спиртом и эфиром и помещают в эксикатор с краном.

Идентификацию выделенного соединения проводят путем определения в нем содержания фосфора и фруктозы (с. 179, 235).

ГЛИКОГЕНОЛИЗ В БЕСКЛЕТОЧНОМ МЫШЕЧНОМ ЭКСТРАКТЕ

Анаэробный распад углеводов в тканях животных завершается образованием молочной кислоты. Интенсивность гликолитических процессов особенно велика в мышечной ткани, о чем свидетельствует значительно большее содержание молочной кислоты в мышцах по сравнению с другими тканями и органами. Наиболее распространенным методом количественного определения молочной кислоты является колориметрический метод Баркера и Саммерсона. Принцип его сводится к разложению молочной кислоты кипячением с концентрированной серной кислотой до ацетальдегида (с. 247), который при взаимодействии с *n*-оксидифенилом в присутствии серной кислоты образует продукт, окрашивающий раствор в фиолетовый цвет. Интенсивность окраски пропорциональна количеству ацетальдегида и, следовательно, молочной кислоты.

Оборудоваиие, реактивы. Цеитрнфуга; фотоэлектроколорнметр; баня водяная; ступка фарфоровая (диаметр 140 мм); воронки стекляиные; пробирки стекляииые хнмнческие; пипетки с одиой меткой иа 1, 3, 5, 10 и 25 мл; колбы конические иа 50 и 100 мл; стакаи стекляииый лабораториый высокий без носнка; лягушка-темпорария, или кролнк, нли морская свиика; гндрокарбоиат натрня (0,4 М); вольфрамат иатрня (10%-иый); сериая кислота (0,66 и., коиц.): гндроксид кальцня (10%-ный), тонко растертый; сульфат медн (4%-ный и 10%-

ный); лед, гликоген (крахмал, 1%-ный); *п*-оксидифенил (1,5%-ный) в гидроксиде натрия (5%-ном); лактат (лития, кальция или цинка) для приготовления стандартного раствора.

10 г свежих мышц лягушки-темпорарии, или кролика, или другого животного охлаждают льдом (с добавлением сухого льда) и в слегка замороженном состоянии при —1—3°С растирают в ледяной дистиллированной воде без предварительного измельчения ножницами. На 2 части мышц берут 3 части воды. Экстракция длится 10—15 мин. Экстракт отделяют от остатков мышечной ткани центрифугированием при 5000 *g* в течение 10 мин при температуре 0°С. Экстракты можно сохранять при —3°С в течение 6—8 ч, но гликогенолитическая активность их с течением времени уменьшается.

В две конические колбы на 50 мл берут по 5 мл свежеприготовленного экстракта и по 1 мл 0,4 *М* раствора гидрокарбоната натрия. В одну из колбочек вливают 1 мл 1%-ного раствора гликогена (или крахмала) и 3 мл воды (общий объем — 10 мл). В другую колбу вливают только 4 мл воды (контроль). Опыт проводят при комнатной температуре в течение 3 ч.

Белки осаждают вольфраматом натрия: приливают 10 мл 10%-ного раствора его, перемешивают и затем при сильном взбалтывании добавляют 10 мл 0,66 н. раствора серной кислоты. Колбы закрывают пробками и еще раз сильно взбалтывают, после чего фильтруют. От каждого фильтрата берут пипеткой по 25 мл в конические колбы на 50—100 мл и в каждую для осаждения углеводов добавляют по 10 мл взвеси гидроксида кальция и 6 мл раствора сульфата меди. Растворы принимают бирюзовую окраску. Наличие зеленоватого оттенка свидетельствует о плохом качестве гидроксида кальция, который заменяют. Перемешивают смесь и оставляют на 30 мин, периодически взбалтывая ее. Растворы должны быть щелочными, и в случае необходимости добавляют к ним по каплям некоторое количество взвеси гидроксида кальция. Через 30 мин жидкость отфильтровывают.

Содержание молочной кислоты в фильтрате определяют следующим образом: в пробирки наливают по 6 мл концентрированной серной кислоты, содержащей по 1 капле 4%-ного раствора сульфата меди, помещают пробирки в ледяную баню и по охлаждении кислоты осторожно наслаивают 1 мл фильтрата. Затем смесь тщательно взбалтывают, доводят до комнатной температуры и помещают в кипящую водяную баню на 5 мин. В результате молочная кислота превращается в ацетальдегид. Хорошо охладив реакционную смесь, к ней добавляют 1 каплю щелочного раствора *п*-оксидифенила так, чтобы избежать попадания его на стенки пробирки, к которым он прилипает. Пробирки ставят в теплую воду при температуре 28—30°С на 30 мин, время от времени взбалтывая их содержимое, с тем чтобы растворить хлопьевидный осадок, образовавшийся после прибавления *п*-оксидифенила. За это время реакционная смесь приобретает голубую окраску. После этого пробы

помещают на 1,5 мин (не более) в бурно кипящую водяную баню. За время кипячения происходит просветление смеси в результате разрушения избытка *n*-оксидифенила, голубая окраска раствора переходит в стойкую фиолетовую. Растворы фотометрируют при 574 нм против серной кислоты в кюветах шириной 0,5 см.

Количество молочной кислоты в пробах находят по стандартной кривой, построенной на основании данных фотометрирования различных количеств стандартного раствора литиевой, кальциевой или цинковой соли молочной кислоты, содержащего от 1 до 5 мкг молочной кислоты в 1 мл раствора. Контрольную пробу обрабатывают так же, как и опытную. Величина экстинкции контроля не должна превышать 0,04. Расчет количества молочной кислоты ведут по формуле:

$$C = \frac{b \cdot 100 \cdot V \cdot V_1 \cdot V_2}{V_3 \cdot V_4 \cdot 1000 \cdot a},$$

где C — содержание молочной кислоты (в мг%); b — количество молочной кислоты, соответствующее экстинкции (E) за вычетом контроля и найденное по стандартной кривой (в мкг); V — общий объем смеси после осаждения белков (в мл); V_1 — общий объем смеси после осаждения углеводов (в мл); V_2 — общий объем мышечного экстракта (в мл); V_3 — объем пробы, взятой для осаждения белков (в мл); V_4 — объем пробы, взятый для осаждения углеводов (в мл); a — навеска исследуемого материала (в г).

КАЧЕСТВЕННЫЕ ПРОБЫ НА МОЛОЧНУЮ КИСЛОТУ

Обнаружение молочной кислоты реактивом Уффельмана

Комплексный фенолят железа фиолетового цвета в присутствии молочной кислоты превращается в молочнокислое железо желтовато-зеленого цвета.

Оборудование, реактивы. Мясорубка; воронки стеклянные; ступка фарфоровая (диаметр 110 мм); пробирки стеклянные химические; 1%-ный раствор хлорида железа (III); фенол (1%-ный); молочная кислота (0,5%-ная).

Мышечную ткань пропускают через мясорубку, затем 2—3 г ее растирают с 5—7 мл воды в фарфоровой ступке. Полученную мышечную кашицу фильтруют через двойной слой марли. Фильтрат кипятят в течение 1 мин, охлаждают, фильтруют через влажный складчатый фильтр.

В три пробирки наливают по 5 мл 1%-ного раствора фенола и в каждую из них прибавляют по каплям 1%-ный раствор хлорида железа (III) до появления интенсивного фиолетового окрашивания (реактив Уффельмана). Затем в одну пробирку приливают 1 мл 0,5%-ного раствора молочной кислоты, во вторую — вытяжку из мышечной ткани, а в третью — 1 мл воды. Содержимое проби-

рок перемешивают. В первой и второй пробирке фиолетовый цвет переходит в зеленовато-желтый, указывающий на наличие молочной кислоты; в третьей пробирке цвет раствора не меняется.

Образование молочной кислоты при гликолизе

Для обнаружения молочной кислоты как конечного продукта гликолиза ее переводят в уксусный альдегид при помощи концентрированной серной кислоты:

$$\underset{\text{Молочная кислота}}{H-\overset{\displaystyle CH_3}{\underset{\displaystyle COOH}{C}}-OH} \xrightarrow{H_2SO_4} \underset{\text{Уксусный альдегид}}{\overset{\displaystyle CH_3}{C}\begin{matrix}\nearrow O \\ \searrow H\end{matrix}} + \underset{\text{Муравьиная кислота}}{H-C\begin{matrix}\nearrow O \\ \searrow OH\end{matrix}}$$

Уксусный альдегид открывают реакцией с вератролом (диметиловым эфиром пирокатехина).

Оборудование, реактивы. Термостат; баня водяная; пробирки стеклянные химические; стакан стеклянный лабораторный высокий без носика; пипетки градуированные на 1, 3 и 10 мл; воронки стеклянные; палочки стеклянные; шпатель; ножницы; трихлоруксусная кислота (20%-ная); сульфат меди (20%-ный); гидроксид кальция (порошок); серная кислота (конц.); лед; вазелиновое масло; гликоген или глюкоза (0,5%-ный) на гидрокарбонате натрия (0,5М); вератрол (0,2%-ный, спиртовой), можно заменить гваяколом (0,2%-ным).

Приготовление инкубационной смеси. Мышцы только что убитой лягушки, или крысы, или кролика быстро измельчают ножницами при охлаждении и полученную мышечную кашицу помещают в две пробирки по 0,5 г в каждую. В контрольную пробирку тотчас же прибавляют 1 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. В обе пробирки вносят по 6 мл 0,5%-ного раствора гликогена (или глюкозы), приготовленного на 0,5М растворе гидрокарбоната натрия. Для создания анаэробных условий в обе пробирки наслаивают по 10 капель вазелинового масла и ставят пробирки в термостат при 37°С на 2 ч.

После инкубации в опытную пробирку добавляют 1 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают и обе пробы фильтруют.

Для осаждения углеводов отбирают по 3 мл фильтрата, прибавляют по 1 мл 20%-ного раствора сульфата меди и по 1 г гидроксида кальция. Пробы тщательно перемешивают и оставляют на 15 мин, время от времени помешивая стеклянной палочкой. Затем пробы фильтруют через сухой фильтр, осторожно отбирают от каждой по 5 капель прозрачного фильтрата и вносят в чистые сухие пробирки. Пробирки помещают в ледяную баню и по каплям добавля-

ют концентрированную серную кислоту (15 капель), осторожно встряхивая. Пробы ставят на 4 мин в кипящую водяную баню и тотчас после этого погружают в воду со льдом. По охлаждении к пробам добавляют по 2 капли раствора вератрола, содержимое пробирок перемешивают. Через некоторое время в опытной пробе, где под влиянием ферментов мышечной ткани прошел гликолиз, появляется ярко-розовое окрашивание. В контрольной пробе появляется слабо-розовое окрашивание, обусловленное присутствием в самой мышечной кашице следов молочной кислоты.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ (ВИДОИЗМЕНЕННЫЙ МЕТОД УМБРАЙТА)

Пировиноградная кислота реагирует с кислым раствором 2,4-динитрофенилгидразина (2,4-ДНФГ). Образующийся в результате реакции 2,4-динитрофенилгидразон пировиноградной кислоты в отличие от гидразонов других кетокислот хорошо растворим в толуоле, при помощи которого его экстрагируют из реакционной смеси. После добавления к толуоловому экстракту спиртового раствора щелочи развивается красно-оранжевое окрашивание, свойственное 2,4-динитрофенилгидразону пировиноградной кислоты:

$$CH_3{-}CO{-}COOH + H_2N{-}NH{-}C_6H_3(NO_2)_2 \longrightarrow CH_3{-}C(COOH){=}N{-}NH{-}C_6H_3(NO_2)_2 + H_2O$$

Пировиноградная кислота — *2,4-ДНФГ* — *2,4-ДНФ-гидразон пировиноградной кислоты*

Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации пировиноградной кислоты.

Оборудование, реактивы. Центрифуга; фотоэлектроколориметр; ступки фарфоровые (диаметр 90 мм); трубки резиновые; пробирки стеклянные химические; пипетки градуированные на 1, 2 и 5 мл; 0,1%-ный раствор 2,4-динитрофенилгидразина (см. приложение), трихлоруксусная кислота (5%-ная); гидроксид калия (2,5%-ный) в этаноле (96%-ном); толуол, насыщенный водой (см. приложение); стандартный раствор пировиноградной кислоты (50 мкг в 1 мл).

Для анализа берут 1 мл исследуемой жидкости (кровь, моча, гемолимфа шелкопряда) или ткань в количестве 0,8—1 г. Белки осаждают девятикратным количеством охлажденной 5%-ной трихлоруксусной кислоты. Смесь тщательно растирают в фарфоровой ступке при охлаждении в течение 10—15 мин, а затем центрифугируют 10 мин при 5000 g. Надосадочную жидкость осторожно сли-

вают и 1 мл ее переносят в пробирку. Одновременно ставят контроль с 1 мл воды. В опытную и контрольную пробы добавляют по 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина. Перемешивают и через 5 мин приливают по 2,5 мл водонасыщенного толуола. Содержимое пробирок встряхивают в течение 3 мин. Затем оставляют стоять для расслоения толуола и воды. Из верхнего, толуолового слоя отбирают сухой градуированной пипеткой с грушей 1 мл жидкости и переносят в чистую сухую пробирку. Добавляют 2 мл спиртового раствора гидроксида калия. Через 20 мин пробы фотометрируют в фотоэлектроколориметре при 465 нм (синий фильтр) против контрольной пробы.

Данные для построения калибровочной кривой получают, наливая в пронумерованные пробирки последовательно 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 и 1 мл стандартного раствора пировиноградной кислоты. В каждую пробирку, за исключением последней, приливают соответственно 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 мл воды. Все остальные операции со стандартными растворами осуществляют в том же порядке, как описано выше. Все пробы должны быть двойными.

При построении стандартной кривой по оси ординат откладывают найденную величину оптической плотности E (среднее арифметическое из двух параллельных определений), а по оси абсцисс — соответствующее ей содержание пировиноградной кислоты в микрограммах.

9 Заказ 238

ЛИПИДЫ И ИХ ОБМЕН

Химический состав, классификация, физиологическая роль и обмен липидов изложены в учебнике (см. с. 161—185 и 449—474).

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

Обычно липиды извлекают из высушенных (обезвоженных) тканей соответствующими органическими растворителями (спирты, эфиры, бензол, толуол, бензин, ацетон, пиридин, хлороформ, четыреххлористый углерод, сероуглерод, петролейный эфир и др.). Для разделения липидов пользуются неодинаковой растворимостью их в различных растворителях: одни из них хорошо растворимы в эфире, но плохо в ацетоне (например, фосфолипиды), другие растворимы в бензоле, но нерастворимы в спирте (холестерол, цереброзиды и др.) и т. д. Резервный жир (масло) извлекается легко. Извлечь связанные липиды можно лишь после разрушения белково-липидных комплексов. Липиды из связанного состояния в свободное переводят либо путем применения гидролизующих средств, либо путем предварительного кипячения материала со спиртом. В последнем случае липиды выделяются в неизменном виде.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СУММАРНЫХ ЛИПИДОВ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Наиболее простым методом определения суммарных липидов в тканях является метод длительного настаивания навесок ткани в хлороформ-метанольной смеси. По разности масс образца до и после экстракции находят процентное содержание липидов. Определение липидов можно проводить в абсолютно сухом или воздушно-сухом материале. При использовании воздушно-сухого материала в нем параллельно с извлечением липидов определяют содержание воды, чтобы выполнить расчеты на абсолютно сухое вещество. Для получения надежных результатов ставят два параллельных определения.

Оборудование, реактивы. Термостат на 105°С; баня водяная; весы аналитические; весы аптечные; шпатель (длина 150 мм); колба коническая на 250 мл; ступка (диаметр 90 мм) с пестиком (высота 90 мм); цилиндр мерный на 100 мл; чашка кристаллизационная; стаканчики для взвешивания (бюксы, размер 45× ×75 мм; эксикатор без крана; бумага фильтровальная плотная (10×18 см и 20×12 см); семена (подсолнечник, грецкий орех, мак и т. п.); метанол; хлороформ.

1,0—1,5 г материала ядер орехов (грецких, фундука) или семян (мака, подсолнечника) отвешивают на аптечных весах, растирают в ступке, затем переносят в высушенные (при 105°С) и взвешенные на аналитических весах пакеты из плотной фильтровальной бумаги (их делают из листов размером 10×18 см по типу обычных аптечных пакетов для порошков). Взвешивают материал вместе с пакетом на аналитических весах и по разности между полученной массой и массой пустого пакета вычисляют величину навески. Количество материала зависит от содержания в нем масла. Семян мака, клещевины, грецких орехов и других, содержащих больше 50% масла, берут от 1 до 1,5 г. При содержании в семенах масла от 30 до 50% их отвешивают до 2,0—2,5 г, при количестве масла ниже 30%—3,0—3,5 г. Пакет с навеской вкладывают в пакет большего размера (его делают из фильтровальной бумаги размером 20×12 см) и помещают в коническую колбу емкостью 250 мл, заливают 35—40 мл метанола и затем приливают в нее 35—40 мл хлороформа. Содержимое колбы перемешивают, закрывают корковой пробкой и оставляют до следующего занятия (на неделю) в темном месте. Пакеты с навесками из одного и того же материала можно помещать в общую склянку.

На следующем занятии пакет с обезжиренным материалом извлекают из колбы, промывают 2—3 раза хлороформом, затем помещают в широкий кристаллизатор и ставят в вытяжной шкаф, чтобы испарился растворитель. После чего сушат в течение 2,5 ч в термостате при 100—105°С. Затем пакет помещают в бюкс, охлаждают в эксикаторе в течение 45 мин и взвешивают. Если после высушивания на пакетах проступают желтые или коричневые полосы, то это объясняется окислением масла, которое было плохо извлечено. В этом случае анализ повторяют, увеличивая объем растворителя и продолжительность извлечения масла.

Определение содержания воды в воздушносухом биологическом материале ставят параллельно с обезжириванием. В сухие взвешенные бюксы для двух параллельных определений, доведенные до постоянной массы, берут по 1 г измельченного материала с точностью до 0,0002 г. После взвешивания бюксы ставят в термостат, крышки с бюксов снимают и оставляют их там же. Сушат 4—6 ч при 100—105°С. Бюксы закрывают крышками и переносят в эксикатор для охлаждения на 45 мин. После охлаждения бюксы взвешивают на тех же весах. Затем повторяют высушивание по 2 ч, охлаждение и взвешивание, пока не доведут раз-

ность между предыдущим и последующим взвешиванием до 0,0002 г. Вычисление процентного содержания воды производят по формуле:

$$C = \frac{100(a - a_1)}{a},$$

где C — процентное содержание воды; a — масса навески до высушивания; a_1 — масса навески после высушивания.

Записывают результаты работы по определению содержания воды в образце по схеме:

Масса бюкса пустого (г)	Массв бюкса с навеской (г)	Наавеска (г)	Масса бюкса с нааеской после перaого н последующих высушиаанний (г)	Масса навески после последнего высушиаання (г)	Содержание воды (%)

Вычисление процентного содержания липидов осуществляют по разности в массе навески до и после их экстракции. Расхождения между двумя параллельными определениями не должны превышать 1—1,5%.

Результаты опыта записывают в таблицу.

Масса аоздушио-сухого материала с пакетом до экстракцин (г)	Мвсса пустого (сухого) пакета (г)	Нвввеска аоздушио-сухого мвтернала (г)	Содержанне аоды (%)	Наавеска вбсолютно сухого материала (г)	Масса матернала с пакетом после экстракцнн (г)	Масса материала без пакета после экстракцнн (г)	Содержание липндоа в абсолютно сухой навеске (г)

Для расчета процентного содержания липидов в исследуемом материале (на абсолютно сухое вещество) прежде всего необходимо сделать пересчет воздушно-сухой навески на абсолютно сухую. Например, установлено, что в данном материале содержится 4,3% воды, а воздушно-сухая навеска составляет 1,25 г. Содержание воды в навеске $\left(\frac{1,25 \cdot 4,3}{100}\right)$0,05 г. Отсюда абсолютно сухая навеска равна (1,25—0,05)1,20 г. Теперь находим массу липидов, извлеченных из навески, по потере в массе навески после проведения экстракции. Например, навеска абсолютно сухого материала до экстракции равна 1,20 г, после экстракции — 0,42 г. Масса липидов в навеске равна (1,20—0,42) 0,78 г.

Исходя из этого, рассчитывают процентное содержание липидов в исследуемом материале (на абсолютно сухое вещество):

$$C = \frac{0,78 \cdot 100}{1,20} = 65,0\ (\%)$$

УСКОРЕННЫЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИПИДОВ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ (ПО Л. КЕЛЬМАН И Ю. ЛЯСКОВСКОЙ)

При выделении липидов из биологического материала происходит их окисление и деградация, приводящие к образованию побочных продуктов. Поэтому выделение липидов надо проводить быстро, в условиях, максимально исключающих влияние таких факторов, как повышенная температура, кислород воздуха, свет, загрязнение следами металлов и т. д.

В настоящее время широко используется эффективный и быстрый метод выделения и очистки липидов в мягких условиях. Для экстракции используют смесь метанола и хлороформа, которая разрушает липопротеидные комплексы и тем самым дает возможность достаточно полно извлечь липиды. Наиболее полная экстракция липидов из тканей достигается тогда, когда ткань гомогенизируют со смесью метанола и хлороформа в соотношении, при котором обеспечивается получение однофазной системы с водой, содержащейся в ткани. Добавляя в гомогенат избыток хлороформа и воду, получают двухфазную систему, которую легко разделить. Слой хлороформа содержит растворенные в нем липиды, нелипидных примесей в нем практически нет. Потеря липидов со слоем метанол — вода и с остатком ткани незначительна. Этим методом экстрагируют липиды из продуктов как животного, так и растительного происхождения.

Оборудование, реактивы. Аппарат для встряхиваиня; весы технические; баня водяная; термостат на 105°С или эксикатор с краном (вакуумный) с оксидом фосфора (V); мясорубка; полиэтиленовые сосуды с закрывающимися крышками или стеклянные банки с пришлифованными пробками; стекла для взвешивания; шпатели (длина 150 мм); палочки стеклянные; цилиндры мерные на 100, 250 и 500 мл; воронка Бюхнера (диаметр 8 мм); колба для фильтрования под вакуумом (Бунзена); насос стеклянный водоструйный лабораторный; воронка делительная на 500 мл; термометр; стаканчики для взвешивания (бюксы); бумага фильтровальная; мясо, пропущенное через мясорубку дважды; метанол; хлороформ; ацетат цинка (2%-ный).

В полиэтиленовую банку с герметически закрывающейся крышкой или в стеклянную банку с пришлифованной пробкой помещают 30—40 г измельченной мышечной ткани, взвешенной на технических весах с точностью до 0,01 г, и приливают 130 мл метанола, перемешивая и разминая ткань до получения однородной массы. Затем добавляют 65 мл хлороформа и встряхивают смесь на аппарате в течение 10 мин (160—170 встряхиваний в 1 мин). После этого прибавляют еще 65 мл хлороформа и встряхивают еще 5 мин. Приливают 65 мл 2%-ного раствора ацетата цинка и встряхивают 30 с.

Содержимое сосуда фильтруют через бумажный фильтр под небольшим разрежением на воронке Бюхнера. Во время фильтрования желательно подавать на гомогенат, находящийся в воронке, струю углекислого газа или азота. К концу фильтрования

уровень вакуума повышают, чтобы обеспечить максимальное удаление растворителя.

Остатки ткани вместе с фильтром и небольшим кусочком фильтровальной бумаги, которым вытирают воронку, переносят в тот же смесительный сосуд и проводят повторную экстракцию 100 мл хлороформа в течение 10 мин. Фильтруют в ту же колбу; сосуд и остатки ткани промывают 50 мл хлороформа. Весь фильтрат собирают в делительную воронку емкостью 500 мл. После отстаивания и разделения слоев сливают хлороформ в сухой мерный цилиндр (на 500 мл) для определения его количества. Аликвотную часть слоя хлороформа, содержащую 200—300 мг липидов, отбирают в высушенный до постоянной массы бюкс и выпаривают досуха на водяной бане при 40—50°С (под тягой). Для предохранения липидов от окисления и ускорения высушивания на образец рекомендуется подавать струю азота. Остаток высушивают до постоянной массы в вакуум-эксикаторе над оксидом фосфора (V) или в сушильном шкафу при 102—105°С.

Содержание липидов в процентах от массы сырой ткани (C) вычисляют по формуле:

$$C = \frac{a \cdot V \cdot 100}{V_1 m},$$

где a — масса липидов в аликвотной порции (в г); V — объем всего слоя хлороформа (в мл); V_1 — объем аликвотной порции хлороформа (в мл); m — навеска мяса (в г).

Установлено, что более длительная экстракция не дает увеличения выхода липидов. Дополнительная экстракция остатка ткани 200 мл хлороформа в течение 30 мин при встряхивании на аппарате дает дополнительно около 1,5% липидов. Такую потерю в большинстве случаев можно считать незначительной.

Описанный выше метод дает высокую воспроизводимость (±0,28%); мягкие условия экстракции делают его приемлемым для изучения состава и свойств выделенных липидов.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ЛИПИДОВ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (ПО М. И. ПРОХОРОВОЙ И З. Н. ТУПИКОВОЙ)

В последнее время достигнуты большие успехи в разделении сложных смесей липидов на группы их и индивидуальные вещества методом тонкослойной хроматографии. Наилучшим носителем является силикагель. Для проявления хроматограмм используют смеси жирорастворителей.

Оборудованне, реактивы. Аппаратура для тоикослойной хроматографнн (с. 15); ступка агатовая; шкаф сушильный на 105—110°С; капнлляр или капнллярная пнпетка на 10 мкл (0,01 мл); снлнкагель марки КСК; гипс; хлороформ; метанол; гексан; днэтнловый эфнр; уксусная кнслота (ледяная); фосфорио-молибденовая кнслота (10%-ная) в спирте (96%-ном); иод кристаллическнй; серная кислота (конц.).

Силикагель из расчета 12,5—15,0 мг, гипс — 1,0—1,2 мг и воду — 0,03—0,04 мл на 1 см^2 поверхности пластинки тщательно перемешивают в агатовой ступке до однородной массы, которую наносят ровным тонким слоем на стеклянную пластинку. Ее сушат в горизонтальном положении на воздухе при комнатной температуре не менее 25 мин, а затем активируют силикагель нагреванием в сушильном шкафу при 105—110°С в течение 30 мин.

Для проведения опыта используют экстракт суммарных липидов мышечной ткани, полученный в предыдущей работе (с. 254). Используя данные о содержании суммарных липидов в хлороформном экстракте, доводят концентрацию их в небольшой порции экстракта до 10%.

На зону старта тонкослойной хроматограммы (1 см от края) наносят 10 мкл экстракта калиброванным капилляром или пипеткой на 0,01 мл. Хроматограмму проявляют смесью гексана, диэтилового эфира и ледяной уксусной кислоты (73 : 25 : 2) в плотно закрытой камере, обложенной внутри фильтровальной бумагой, при восходящем движении проявителя в течение времени, необходимого для его поднятия на $^2/_3$ высоты закрепленного слоя силикагеля (примерно около 1 ч). Пластинку сушат под тягой 30 мин и опрыскивают 10%-ным раствором фосфорномолибденовой кислоты, после чего нагревают при 80—100°С до появления синих пятен на желтом фоне.

Известно, что в первом пятне от линии старта сосредоточены фосфолипиды, во втором — неидентифицированные липиды, в третьем — холестерол, в четвертом — моноглицериды, в пятом — диглицериды, в шестом — свободные высшие жирные кислоты, в седьмом — триглицериды и в восьмом — стериды. Непосредственно к линии фронта проявителя примыкают углеводороды.

ЖИРЫ (ГЛИЦЕРИДЫ)

Данные о химическом составе жиров, их строении, распространении в природе, локализации в клетках и тканях приведены в учебнике (с. 163—169).

Для характеристики химического состава жиров и масел необходимо определить их химические константы. Химические константы жира характеризуют:

1) количество свободных кислот в 1 г жира (кислотное число);
2) количество связанных кислот в 1 г жира (эфирное число);
3) общее количество кислот в 1 г жира (число омыления);
4) количество непредельных кислот (иодное число).

Существуют также и другие константы.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ЖИРОВ

Выделение жира из молока

Оборудование, реактивы. Пробирки стеклянные химические; цилиндр мерный на 10 мл; чашка выпарительная на 50 мл; баня водяная; карбонат натрия (10%-ный); эфир диэтиловый.

К 6 мл цельного молока прибавляют 2 мл 10%-ного раствора карбоната натрия, хорошо перемешивают и взбалтывают с 5 мл эфира. Эфир сливают в выпарительную чашку и выпаривают досуха на заранее разогретой водяной бане *(в вытяжном шкафу; все горелки в лаборатории должны быть погашены)*. По испарении эфира остается масло — молочный жир.

Разделение жирных кислот методом хроматографии распределения на бумаге

Качественный анализ жирных кислот с помощью метода хроматографии распределения на бумаге в настоящее время широко применяется для исследования различных экстрактов из растений. Он является рекогносцировочным. После установления качественного состава кислот в экстракте проводят их количественное определение. Главная трудность для хроматографии небольших количеств жирных кислот с низкой молекулярной массой заключается в их летучести. Простой метод хроматографии жирных кислот в форме менее летучих аммонийных солей разработали Кеннеди и Баркер (1951 г.). В этом случае для хроматографии применяют смеси, содержащие свободный аммиак. Наличие в атмосфере камеры свободного аммиака препятствует разложению аммонийных солей жирных кислот.

Оборудование, реактивы. Сушильный шкаф; линейка; ванночки фотографические; сосуд для хроматографии с притертой крышкой; палочки стеклянные (тонкие); микропипетки на 0,01 мл (3 шт.); пластинки стеклянные; хроматографическая бумага; щавелевая кислота (1%-ная); уксусная, н-масляная и н-капроновая кислоты (0,1М), нейтрализованные аммиаком; аммиак (конц.); смесь этанола, воды и гидроксида аммония (95 : 5 : 1); раствор для обнаружения кислот на хроматограмме: бромфеноловый синий (0,05%-ный) в лимонной кислоте (0,2%-ной) (см. приложение).

Подготовка бумаги. Лист хроматографической бумаги (30×40 см) помещают в ванночку с 1%-ной щавелевой кислотой на 15 мин, а затем бумагу тщательно промывают сначала проточной, а затем дистиллированной водой. Промытую бумагу высушивают. Предварительная обработка бумаги 1%-ной щавелевой кислотой необходима для удаления металлов и других загрязнений, которые могут мешать определению. Иногда бумагу промывают проявителями, которыми пользуются для хроматографического разделения кислот.

Простым карандашом проводят линию на расстоянии 3 см от короткого края листа бумаги. На стартовой линии делают 4 отметки, первая из которых должна быть на расстоянии 10 см от края листа; расстояния между точками равны 3 см (рис. 42). Под размеченный край бумаги подкладывают две стеклянные пластинки так, чтобы стартовая линия приходилась над зазором между ними шириной 0,8 см (стр. 9). При помощи третьей стеклянной пластинки бумагу прижимают к одной из нижних пластинок.

Нанесение на бумагу растворов кислот. Техника нанесения растворов на хроматограмму описана выше (с. 9 и 13). В точки 1,2 и 3 наносят 0,1 М растворы исследуемых аммонийных солей жирных кислот: в первую точку — аммонийную соль уксусной, во вторую — н-масляной и в третью — н-капроновой кислот; на четвертую последовательно с подсушиванием (с. 13) наносят смесь всех трех соединений. В каждом пятне содержится примерно 10 мкг аммонийной соли каждой кислоты.

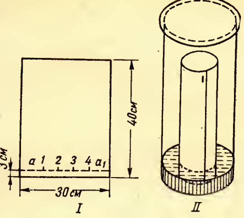


Рис. 42. Прибор для разделения жирных кислот методом восходящей хроматографии распределения на бумаге:

I — схема разметки хроматографической бумаги; aa_1 — линия старта; *1—4*—точки нанесения аммонийных солей жирных кислот; *II* — сосуд для восходящей хроматографии с хроматограммой, свернутой в цилиндр.

Хроматограмму свертывают в форме цилиндра (рис. 42), закрепляют каждый конец стеклянной палочкой и ставят в цилиндр, в который заранее наливают 100 мл проявителя. Хроматограмму погружают в жидкость на 1,5—2 см. Цилиндр закрывают крышкой и ждут, пока фронт проявителя (этанол — вода — аммиак в соотношении 95 : 5 : 1) поднимется на 30—35 см.

Обнаружение жирных кислот. Хроматограмму вынимают из цилиндра, отмечают карандашом границу фронта проявителя, подсушивают в вытяжном шкафу и затем сушат 10 мин в сушильном шкафу при 100°С. Сухую хроматограмму опрыскивают из пульверизатора 0,05%-ным раствором бромфенолового синего в 0,2%-ной лимонной кислоте.

Кислоты обнаруживаются на хроматограмме в виде синих пятен на желтом фоне. Рассчитывают коэффициент подвижности (R_f) для каждой кислоты (с. 14).

Обнаружение аммонийных солей жирных кислот бромфеноловым синим основано на способности этого красителя менять окраску в зависимости от значения pH среды.

В сильнокислой среде (pH меньше 3) бромфеноловый синий находится в лактонной форме желтого цвета, а в менее кислой среде (pH больше 4,6) он находится в хиноидной форме синего цвета (см. с. 258).

Присутствие лимонной кислоты в растворе для обнаружения жирных кислот способствует образованию желтой лактонной формы индикатора, поэтому фон хроматограммы окрашен в жел-

pH=3 *(или ниже)*
pH=4,6 *(или выше)*

Бромфеноловый синий (хиноидная форма, синяя) — *Бромфеноловый синий (лактонная форма, желтая)*

тый цвет. Аммонийные соли жирных кислот изменяют значения pH, уменьшают кислотность, что приводит к превращению индикатора в хиноидную форму.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ЖИРЫ

Качественная реакция на жиры и масла

Оборудование, реактивы. Стекла часовые или пластинки стеклянные; масло (любое); осмиевая кислота (1%-ная).

К капле масла на часовом стекле добавляют одну каплю 1%-ного раствора осмиевой кислоты. Масло окрашивается в черный цвет. Кроме осмиевой кислоты, в качестве реактива на масла применяют краситель судан III, который окрашивает масла в различные оттенки красного цвета. Все эти реактивы — 1%-ная осмиевая кислота, судан III и другие — пригодны для микрохимических определений. Срезы тканей (растительных или животных) смачивают одним из этих реактивов и наблюдают под микроскопом: капли масла в ткани окрашиваются в черный или красный цвет.

Обнаружение глицерина в жирах (акролеиновая проба)

Оборудование, реактивы. Пробирки стеклянные химические; масло растительное (или любой жир); воск; бумага фильтровальная; гидросульфат калия (безводный); нитрат серебра (1%-ный); гидроксид аммония (5%-ный); фуксинсернистая кислота (см. приложение).

В пробирку вносят 2—3 капли масла (жира) и прибавляют пятикратное количество безводного гидросульфата калия. Нагревают пробирку осторожно, но сильно *(в вытяжном шкафу)* до появления белых густых паров. Отмечают *(осторожно!)* резкий раздражающий запах акролеина. Если в эти пары внести кусочек фильтровальной бумаги, смоченной аммиачным раствором оксида серебра (см. приложение), то бумага почернеет вследствие выделения металлического серебра. Затем у отверстия пробирки держат фильтровальную бумагу, смоченную раствором фуксинсернистой кислоты. Появляется ярко-розовое пятно. Обе эти реакции (с ам-

миачным раствором оксида серебра и с фуксинсернистой кислотой) являются качественными реакциями на альдегиды, в данном случае — на акролеин.

Повторяют опыт, но вместо масла берут кусочек воска.

Акролеиновая проба проводится для обнаружения в липидах глицерина. При нагревании глицерина в присутствии водоотнимающих средств (гидросульфат калия, борная кислота, сульфат магния) происходит образование непредельного акрилового альдегида — акролеина:

$$\begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ HO-C-H \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ H \end{matrix} \xrightarrow{-H_2O} \left[\begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ CH \\ \| \\ C\overset{OH}{\underset{H}{\diagdown}} \end{matrix}\right] \longrightarrow \begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ CH_2 \\ | \\ C\overset{O}{\underset{H}{\diagdown}} \end{matrix} \xrightarrow{-H_2O} \begin{matrix} CH_2 \\ \| \\ CH \\ | \\ C\overset{O}{\underset{H}{\diagdown}} \end{matrix}$$

Глицерин *Акролеин*

Липиды, не содержащие глицерина (воски, стериды и др.), акролеиновой пробы не дают. При проведении этой реакции с кусочком воска образования акролеина не происходит.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИРОВ

Количественное определение свободных липидов по Сокслету

Классический метод количественного определения свободных липидов по Сокслету основан на способности ряда органических растворителей (диэтиловый эфир, петролейный эфир с температурой кипения не выше 60°С, хлороформ, четыреххлористый углерод, дихлорэтан и др.) количественно извлекать свободные липиды из сухого материала растительного или животного происхождения. Чаще всего для количественного определения жиров используется диэтиловый эфир. Последний должен быть перегнанным, сухим и очищенным от пероксидов.

В эфирную вытяжку переходят жиры (триглицериды), жирные кислоты, стеролы, лецитин, пигменты (например, хлорофилл), воски, эфирные масла и др. Вследствие такой неоднородности данную смесь часто называют фракцией «сырого жира».

Экстракцию жиров проводят в автоматически действующем аппарате Сокслета (рис. 43). Колбу с растворителем нагревают на электрической водяной бане с закрытой спиралью. Количество растворителя не должно превышать $^3/_4$ объема колбы. Навеску помещают в экстрактор в специальном бумажном патроне или пакетике. Через холодильник для хорошего охлаждения пропускают сильный ток воды. Однако холодильник не должен отпотевать. Не допускается также накопление влаги на шлифах прибора, которые полезно защитить ловушками из фильтровальной бумаги.

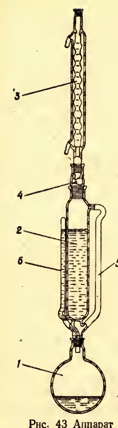
Определить колнчество липндов в навеске можно двумя способами:

1) прямым методом (путем выпарнвання растворителя нз колбы и взвешнвання остающнхся в ней экстрагированных липндов);

2) косвенным методом (по потере в массе навескн в процессе экстракцни из нее лнпндов).

При работе по первому способу по окончаннн экстракцин эфнр нз колбы, в которую собран извлеченный жнр, перегоняют (в токе углекислого газа нлн азота во нзбежание окисления ненасыщенных кнслот). Жнр в колбе сушат лнбо в токе нндиферентного газа прн 100°С, либо в вакуум-эксикаторе н затем взвешнвают. По разннце между массой пустой колбы н колбы с жнром узнают количество извлеченного масла.

Второй способ — определение количества жнра по уменьшенню массы материала после экстракцнн, разработан С. В. Рушковским н А. Н. Ермаковым. Этот метод проще первого и вполне надежен при определеннях жнра, где не требуется проводнть нсследовання самого жнра. Нпже приводится пропнсь работы определення содержання жнра в этой моднфнкацнн.



Рнс. 43 Аппарат Сокслета:

1 — колба с растворнтелем; *2* — экстрактор; *3* — шариковый колодильннк; *4* — промежуточная насадка; *5*—пароотводная трубка; *6*—снфон.

Оборудоваиие, реактивы. Аппарат Сокслета; весы аналнтнческие; шкаф сушильный на 105°С; эксикатор без крана; бумага фильтровальная обезжнренная; стакаичнкн для взвешивания (бюксы); ступка (диаметр 90 мм) с пестиком (90 мм); материал растительный (семена, ядра орехов и т. п.); эфнр диэтнловый (сухой, очнщенный от пероксидов); перманганат калия (4%-ный); гндроксид натрия (40%-ный).

Очнстка днэтнлового эфнра. 500 мл эфнра смешнвают с 50 мл 4%-ного раствора перманганата калня н 5 мл 40%-ного гндроксида натрия нлн калня, взбалтывают и оставляют в темноте. Через сутки смесь разделяют в делнтельной воронке. Ннжннй слой слнвают, а верхннй (эфнр) промывают 5—6 раз днстнллированной водой в соотношенин 2 : 1. Эфир высушивают безводным сульфатом натрня в теченне суток, перегоняют н хранят в темноте. По качественной реакцнн с ноднидом калия проверяют отсутствие в нем пероксидов.

Для определення жира используют воздушно-сухой материал. Еслн предварнтельно сушнть материал в сушильном шкафу при 100—105°С, то непредельные кислоты — составные частн растнтельного масла — подвергаются значнтельному окнсленню. Окнсленное растнтельное масло трудно извлекается нз навескн, что приводнт к заннженню результатов аналнза. Высу-

шивать материал можно только в вакуум-сушильном шкафу с подачей в него сухого углекислого газа или азота.

Примерно 2 г воздушно-сухого материала (семена льна, мака, ядра орехов и т. п.) тщательно растирают в ступке до однородной массы. Получение масла из материала затрудняется, если материал остается частично нерастертым.

Измельченный материал переносят в пакетик из обезжиренной плотной фильтровальной бумаги. Пакетики для каждого определения предварительно высушивают до постоянной массы и взвешивают на аналитических весах. После взвешивания пакетика с помещенным в него исследуемым материалом его переносят в аппарат Сокслета. В один экстрактор вносят 4—6 пакетиков с различными образцами семян. Пакетики закладывают в экстрактор, заранее наполненный эфиром так, чтобы они полностью были погружены в растворитель. Этим достигается их предварительное пропитывание эфиром, причем часть жира переходит в раствор.

Затем все части аппарата Сокслета герметически соединяют, включают холодильник и источник нагревания. Во время работы аппарат должен стоять в строго вертикальном положении. Время извлечения жира в аппарате различно и зависит от качества самого материала, степени его измельчения, величины навески, от быстроты наполнения экстрактора эфиром после опорожнения и др. Если аппарат работает со скоростью наполнения экстрактора эфиром от 10 до 20 раз в 1 ч, то полностью жир обычно извлекается через 5—12 ч. Однако иногда приходится проводить экстрагирование жиров в течение более длительного промежутка времени. Ориентировочно полноту извлечения масла можно установить пробой на фильтровальной бумаге. Для этого из экстрактора берут пипеткой немного эфира и помещают на чистую фильтровальную бумагу. Отсутствие маслянистого пятна на бумаге после испарения эфира указывает на полноту извлечения масла.

По окончании экстракции обезжиренные пакетики вынимают из аппарата Сокслета и высушивают сначала на стекле в вытяжном шкафу, а после испарения эфира — в сушильном шкафу при 100—105°С до постоянной массы (во взвешенных бюксах). Для полного высушивания требуется обычно 5 ч. Пакетики взвешивают на аналитических весах.

Параллельно с определением жира берут навеску материала в бюкс для определения его влажности (с. 251). Желательно проводить высушивание материала в вакуум-сушильном шкафу. Для полного высушивания растительного материала достаточно 6—7 ч пребывания его в вакуумной камере (10—12 мм) при 70—75°С. По разности в массе определяют количество воды в сыром материале.

Содержание жира выражают в процентах на абсолютно сухое вещество (схему расчета см. на с. 252).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТ ЖИРОВ

Определение насыщенности жиров

Ненасыщенность жира зависит от присутствия в его составе непредельных жирных кислот. Ненасыщенные соединения легко присоединяют по два атома галогена по месту каждой двойной связи. Обычно степень ненасыщенности определяют иодным числом. Иодное число измеряется количеством граммов иода, которое присоединяется к 100 г жира.

Иодное число является одним из наиболее важных химических показателей для масел (жиров). Оно позволяет судить о степени ненасыщенности масла (жира), о склонности его к «высыханию», прогорканию и другим изменениям, происходящим при хранении и переработке пищевых и технических масел.

С двойными связями, кроме иода, реагируют также и другие галогены — хлор и бром. Однако они не только присоединяются по двойным связям, но и замещают атомы водорода в радикале. Иод же в определенных условиях реагирует преимущественно с двойными связями.

Механизм реакции взаимодействия ненасыщенных жирных кислот с иодом таков:

$$\begin{matrix} CH_3-(CH_2)_7-CH \\ \| \\ HOOC-(CH_2)_7-CH \end{matrix} + I_2 \longrightarrow \begin{matrix} H_3C-(CH_2)_7-CH\ \delta^+\ \delta^- \\ \Vert\!\!\rightarrow I\cdots I \longrightarrow \\ HOOC-(CH_2)_7-CH \end{matrix}$$

Олеиновая кислота

$$\longrightarrow \left[\begin{matrix} H_3C-(CH_2)_7-CH \\ | \quad \overset{+}{I} \\ HOOC-(CH_2)_7-CH \end{matrix}\right] I^- \longrightarrow \begin{matrix} H_3C-(CH_2)_7-CHI \\ | \\ HOOC-(CH_2)_7-CHI \end{matrix}$$

Сравнение ненасыщенности различных жиров

Оборудоваиие, реактивы. Весы торзионные; микробюретка; пробирки стекляниые химические; пипетка с одиой меткой на 3 мл; хлороформ; иод (0,001 и.) в хлороформе; различные жиры (коровье масло, свиное сало, подсолнечное масло, маргарии).

Отвешивают в пробирки по 0,5 г различных жиров (свиное сало, коровье масло, маргарин, подсолнечное масло). Растворяют каждый жир в 3 мл хлороформа и титруют из микробюретки 0,001 н. раствором иода в хлороформе до отчетливо розовой окраски. Записывают объем раствора иода, пошедшего на насыщение каждого вида жира. Располагают исследованные жиры по убывающей степени насыщенности.

Определение иодного числа

Оборудоваиие, реактивы. Весы аиалитические; пробирки стеклянные химические; пипетка градуироваиная на 10 мл; колбы коиические иа 250 мл с пробками (2 шт.); бюретка с краном на 25 мл; цилиндр мериый на 100 мл; рас-

тительное масло; спирт этиловый; раствор иода (0,2 н.) в спирте (96%-ном): (25,4 г свежевозогнанного иода переносят в мерную колбу на 1000 мл и растворяют в спирте); раствор гипосульфита (0,1 н.); крахмал (0,5%-ный).

В сухую коническую колбу емкостью 250 мл с пришлифованной стеклянной пробкой помещают исследуемое масло. Навеску берут на аналитических весах следующим образом: взвешивают склянку (из-под пенициллина) с маслом и пипеткой в пробке, отмеривают из нее пипеткой в колбу 3—4 капли масла и снова взвешивают склянку. По разности масс определяют величину навески масла. В колбу добавляют 25 мл спирта для растворения навески. Если масло плохо растворяется, можно подогреть колбу на водяной бане. Во второй колбе ставят «слепой опыт» (контроль), т. е. берут в нее 25 мл спирта. В каждую колбу (опыт и контроль) прибавляют по 12,5 мл 0,2 н. спиртового раствора иода (из бюретки), смешивают, приливают по 100 мл дистиллированной воды и хорошо встряхивают, закрыв пробкой. Через 5 мин содержимое колб оттитровывают 0,1 н. раствором тиосульфата сначала до появления слабо-желтого окрашивания, а потом, прибавив 1 мл раствора крахмала, титруют до исчезновения синего окрашивания.

Разность между количеством 0,1 н. раствора тиосульфата, затраченного на титрование опыта и контроля, является показателем количества иода, связанного навеской масла. Иодное число (в г) вычисляют по формуле:

$$\text{Иодное число} = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0{,}0127 \cdot 100}{a},$$

где V_1 — количество 0,1 н. раствора $Na_2S_2O_3$, пошедшее на титрование контроля (в мл); V_2 — количество 0,1 н. раствора $Na_2S_2O_3$, пошедшее на титрование в опыте (в мл); 0,0127—титр тиосульфата по иоду; a — навеска жира (в г).

Расхождения в параллельных опытах допускаются лишь в десятых долях получаемых иодных чисел.

Определение кислотного числа жиров

Кислотное число характеризует кислотность жира, и измеряется оно числом миллиграммов гидроксида калия, необходимого для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира.

Кислотное число наряду с другими физико-химическими показателями характеризует качество масла. Например, если масло получено из зрелых семян, то свободных жирных кислот в нем мало, в масле же из незрелых семян содержание свободных жирных кислот значительно. При хранении масла наблюдается гидролиз глицеридов, который приводит к накоплению свободных жирных кислот, т. е. к возрастанию кислотности. Повышенная кислотность масла указывает на снижение его качества.

Метод определения кислотного числа основан на том, что свободные жирные кислоты, имеющиеся в масле, оттитровывают 0,1 н. раствором KOH. Обычно титрование проводят гидроксидом калия, а не гидроксидом натрия, так как образующиеся калиевые мыла лучше растворимы в условиях опыта.

Оборудоваиие, реактивы. Весы аиалитические; колба коиическая иа 50 или 100 мл; цилиндры мериые иа 10 или 25 мл; пипетки с одиой меткой иа 1 или 2 мл; бюретка с краиом иа 25 или 50 мл; смесь спирта с серным эфиром (1 : 1); гидроксид калия (0,1 н.) в спирте (96%-ном); масло растительиое или жир животиый.

Навеску масла для определения берут на аналитических весах по разности (с. 262). Для определения кислотного числа навеску жира (масла) в 2—3 г, взвешенную на аналитических весах, помещают в коническую колбу емкостью 50—100 мл и растворяют в 10—15 мл нейтральной смеси спирта и эфира (1 : 1). Для нейтрализации к смеси спирта и эфира (1 : 1) прибавляют 3—4 капли фенолфталеина и затем 0,1 н. спиртовой раствор гидроксида калия по каплям, до появления слабого розового окрашивания. После растворения жира вносят 1—2 капли раствора фенолфталеина и титруют 0,1 н. спиртовым раствором гидроксида калия до слаборозового окрашивания. Окраска после взбалтывания не должна исчезать в течение 0,5—1 мин.

Кислотное число вычисляют по формуле:

$$\text{Кислотное число} = \frac{V \cdot T}{a},$$

где V — количество (в мл) 0,1 н. раствора KOH, израсходованное на титрование взятой навески жира; T — титр 0,1 н. раствора гидроксида калия (в мг); a — навеска жира (в г).

Определение числа омыления жиров

Числом омыления называется число миллиграммов гидроксида калия, необходимое для нейтрализации как свободных, так и связанных (в форме глицеридов) жирных кислот, содержащихся в 1 г масла.

Содержание свободных жирных кислот в масле характеризуется кислотным числом (см. выше), а содержание связанных в виде эфиров кислот — эфирным числом, т. е. числом миллиграммов гидроксида калия, необходимого для нейтрализации освобождающихся при омылении эфирных связей жирных кислот в 1 г масла.

Экспериментально эфирное число определяется по разности между числом омыления и кислотным числом.

Оборудоваиие, реактивы. Весы аиалитические; баня водяиая; колбы коиические иа 50 мл с обратиыми холодильииками (2 шт.); пипетки с одиой меткой иа 1 мл; бюретки с краном иа 25 или 50 мл (2 шт.); гидроксид калия (0,5 и.) в спирте (96%-иом) (см. приложеиие); соляная кислота (0,5 и., титроваиная); феиолфталеин (1%-ный).

В одну колбу емкостью 50 мл вносят 0,5 г жира, отвешенного на аналитических весах, а в другую — 0,5 мл воды. Затем в обе колбы добавляют из бюретки по 15 мл 0,5 н. спиртового раствора гидроксида калия. Колбы закрывают пробками с обратными воздушными холодильниками (длина 70 см) и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30—40 мин при периодическом встряхивании. Следят, чтобы жидкость в колбе слабо кипела и чтобы верхняя часть трубки не нагревалась.

По окончании омыления в каждую колбу добавляют по 15—20 мл воды, по 3—4 капли фенолфталеина и титруют 0,5 н. раствором соляной кислоты до исчезновения розового окрашивания (определяют количество несвязавшейся щелочи). Исходя из того, что 1 мл 0,5 н. раствора гидроксида калия соответствует 28 мг его, расчет числа омыления ведут по формуле:

$$\text{Число омыления} = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 28}{a},$$

где V_1 — объем (в мл) 0,5 н. раствора HCl, затраченный на титрование контроля (колба с водой); V_2 — объем (в мл) 0,5 н. раствора HCl, затраченный на титрование опыта (колба с жиром); a — масса жира (в г).

ОБМЕН ЖИРОВ

Переваривание жиров липазой

В результате действия липаз жиры (триглицериды) подвергаются гидролизу, расщепляясь на глицерин и жирные кислоты (см. учебник, с. 449).

Большое значение в процессе переваривания жиров имеет желчь, содержащая соли желчных кислот. Желчные кислоты, воздействуя на жиры и масла, переводят их в чрезвычайно тонкую эмульсию, диаметр частиц которой не превышает 0,5 мк. Эмульгирование жира приводит к значительному увеличению поверхности соприкосновения жира с водным раствором липазы, что облегчает ферментативный гидролиз жира. Соли желчных кислот, кроме того, активируют малоактивную липазу сока поджелудочной железы, переводя ее в активный фермент. Механизм активации липазы желчными кислотами остается не вполне выясненным. Желчные кислоты также взаимодействуют со свободными жирными кислотами с образованием растворимых соединений, способных всасываться.

Лучше всего наблюдать гидролиз жира под влиянием липазы сока поджелудочной железы. Активатором липазы является желчь (желчные кислоты). В качестве субстрата обычно берут молоко, жир которого, находясь в эмульгированном состоянии, быстро расщепляется на глицерин и жирные кислоты. Об активности липазы судят по количеству жирных кислот, образовавшихся за

определенный промежуток времени в результате гидролиза жира. Количество жирных кислот определяют титрованием раствором щелочи отдельных проб молока, взятых до гидролиза и в процессе гидролиза.

Оборудование, реактивы. Термостат на 37°C; колбы конические на 100 мл (6 шт.); пипетки с одной меткой на 1 мл и на 10 мл; ступка (диаметр 110 мм) с пестиком (высота 110 мм); воронка стеклянная; цилиндр мерный на 50 мл; марля; поджелудочная железа (свежая); молоко, прокипяченное и охлажденное до 37°C; желчь; фенолфталеин (1%-ный); гидроксид натрия (0,1 н.); липаза лиофилизированная (из поджелудочной железы свиньи) Олайненского завода химических реактивов фирма «Биохимреактив».

При отсутствии лиофилизированного продажного препарата фермента липазу получают из свежей или свежезамороженной поджелудочной железы свиньи, быка или другого животного, так как она легко разрушается, особенно при действии кислот; в хранившейся даже небольшое время панкреатической железе липаза уже не открывается. Поджелудочную железу очищают от жира, пропускают через мясорубку и тщательно растирают в ступке с тройным количеством воды (при растирании можно добавить песок или толченое стекло). Полученную смесь отфильтровывают через 2—3 слоя марли.

В три конические колбы, емкостью 100 мл каждая, отмеривают цилиндром по 50 мл молока и добавляют в колбу 1 и 2 по 2 мл вытяжки липазы или по 1 мл раствора лиофилизированной липазы, содержащего 1 мг препарата в 1 мл, в колбу 3 (контроль) — столько же предварительно прокипяченной вытяжки. В колбу 1 добавляют также 5—6 капель желчи (для активирования липазы). Быстро перемешивают содержимое каждой колбы, сейчас же отбирают пипеткой по 10 мл жидкости и переносят их в три другие колбы (для титрования). Первые колбы (1, 2 и 3) ставят в термостат или в водяную баню при 37—40°C.

В колбы для титрования добавляют по 10 мл воды и по 2—3 капли раствора фенолфталеина. Оттитровывают содержимое каждой колбы 0,1 н. раствором гидроксида натрия до слабо-розового окрашивания при непрерывном и тщательном помешивании. Результаты титрования записывают в таблицу.

Жидкости	Номера колб		
	1	2	3 (контроль)
Молоко	50 мл,	50 мл	50 мл
Вытяжка липазы	2 мл	2 мл	2 мл (прокипяченная)
Желчь	5—6 капель	—	
Затрачено 0,1 н. раствора гидроксида натрия:			
1-е титрование (0′)			
2-е » (15′)			
3-е » (30′)			
4-е » (60′)			
5-е » (90′)			

Еще четыре раза, через 15, 30, 60 и 90 мин после начала инкубации, берут из колб 1, 2 и 3 пробы по 10 мл и оттитровывают их с добавлением воды и фенолфталеина, как описано выше. Данные также заносят в таблицу.

Полученные результаты наносят на график и вычерчивают кривые, показывающие действие липазы во времени в зависимости от наличия или отсутствия желчи. Для этого по оси абсцисс откладывают время, а по оси ординат — объем в миллилитрах 0,1 н. раствора гидроксида натрия, пошедший на титрование свободных жирных кислот, образовавшихся за данный промежуток времени.

На основании полученных результатов делают вывод о влиянии желчи на переваривание жира.

ФОСФАТИДЫ

Фосфатиды (фосфолипиды) представляют собой наиболее разнообразную и метаболически активную фракцию липидов (см. учебник, с. 176—183 и 469—474).

ВЫДЕЛЕНИЕ ФОСФАТИДОВ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Выделение лецитина из вареного желтка и растворимость его в разных растворителях

Оборудование, реактивы. Баня водяная; микроскоп; стекла предметные и покровные; ступка (диаметр 140 мм) с пестиком (высота 120 мм); цилиндр мерный на 50 мл; воронка стеклянная; чашки выпарительные (2 шт.); палочки стеклянные; колба коническая на 100 мл; стакан стеклянный лабораторный с носиком на 100 мл; бумага фильтровальная; яичный желток (вареный); эфир диэтиловый; спирт этиловый; ацетон.

Желток вареного яйца тщательно растирают в ступке с 40 мл эфира. (*Осторожно! Все горелки в лаборатории должны быть погашены.*) Затем эфир сливают на воронку со складчатым фильтром. Остаток в ступке дважды промывают порциями эфира по 5 мл, сливая их на фильтр. Фильтрат переливают из колбы в выпарительную чашку и выпаривают досуха на водяной бане (*в вытяжном шкафу. Осторожно! Огонь под баней должен быть погашен*). В сухом остатке содержится смесь жиров и липоидов. Его дважды (порциями по 8 мл) тщательно обрабатывают кипящим этиловым спиртом. Спиртовые вытяжки после охлаждения отфильтровывают через сухой фильтр в выпарительную чашку. Фильтрат должен быть прозрачным. 2 мл фильтрата переносят в пробирку, а из остального спирт выпаривают на водяной бане. Остаток представляет собой сырой (неочищенный) лецитин. Обработка спиртом проводится для отделения лецитина от жира; лецитин растворим в спирте, а жир в холодном спирте заметно не растворяется. Лецитин снова растворяют в 10 мл эфира и полученный раствор при по-

мешивании приливают к 30 мл сухого ацетона. Лецитин выпадает в осадок и собирается на дне стакана. Жидкость из стакана осторожно сливают, 2—3 капли взвеси осадка лецитина переносят на предметное стекло, дают ацетону испариться, наносят в то же место еще 2—3 капли и после испарения добавляют каплю воды. Положив покровное стекло, наблюдают под микроскопом образование миелиновых фигур в виде длинных закрученных нитей с утолщениями на концах.

Остаток лецитина переносят на сухую фильтровальную бумагу и используют для качественных реакций (см. ниже).

К 2 мл спиртового раствора лецитина (см. выше) добавляют по каплям воду и смесь сильно взбалтывают. Наблюдают образование устойчивой эмульсии лецитина. Сводят в таблицу данные о растворимости, набухаемости, цвете осадка и др.

Выделение фосфатидов из мозга

Оборудование, реактивы. Баня водяная: ступка (диаметр 110 мм) с пестиком (высота 120 мм); скальпель; пластинки стеклянные; колба круглодонная на 50 мл с обратным холодильником; воронки стеклянные; бумага фильтровальная; мозг, пропущенный через мясорубку; гипс; спирт этиловый.

2 г мозга растирают в ступке с 5—6 г гипса до получения густой кашицы. Кашицу при помощи скальпеля или стеклянной палочки распределяют тонким слоем на стекле и высушивают при 60°С в сушильном шкафу или держат стекло над пламенем горелки на расстоянии 15—20 см от нее, контролируя степень нагрева стекла на ощупь.

Высушенный с гипсом мозг соскабливают скальпелем со стекла и мелко измельчают в ступке. Полученный сухой порошок переносят в колбу и заливают 10 мл спирта. К колбе присоединяют обратный холодильник и помещают ее на 15—20 мин в нагретую до 70°С водяную баню. Для лучшей экстракции содержимое колбы периодически встряхивают. Если значительная часть спирта испарится, то его доливают. По окончании экстракции колбу охлаждают и спиртовую вытяжку отфильтровывают. Фильтрат используют для реакций на лецитин.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ЛЕЦИТИН С ХЛОРИДОМ КАДМИЯ

Оборудование, реактивы. Пробирки стеклянные химические; хлорид кадмия (насыщ.) в этаноле (96%-ном).

К 2—3 мл спиртового раствора лецитина, полученного в предыдущем опыте, добавляют 1 мл насыщенного спиртового раствора хлорида кадмия. Выпадает белый хлопьевидный осадок комплексного соединения лецитина с хлоридом кадмия. Эту реакцию не дают растворы холестерола и растительных масел.

Оборудование, реактивы. Очки защитные; щипцы тигельные; тигель низкий (диаметр 45 мм) с крышкой; пробирки стеклянные химические; палочки стеклянные; стакан стеклянный лабораторный с носиком на 50 мл; воронка стеклянная; пипетка с одной меткой на 1 мл; бумага фильтровальная; лецитин сухой, полученный в опыте (с. 267); нитрат калия; карбонат натрия (безводный); бумага лакмусовая красная; азотная кислота (10%-ная); молибденовый реактив (см. приложение); магнезиальная смесь (см. приложение); натрий или калий металлический; сульфат железа (II) (1%-ный); хлорид железа (III) (1%-ный); соляная кислота (10%-ная); аммиак (конц.).

Обнаружение фосфора

Часть сухого лецитина переносят в фарфоровый тигель и тщательно смешивают с двух-, трехкратным количеством смеси, состоящей из двух частей карбоната натрия и одной части нитрата калия. Тигель прикрывают крышкой и осторожно нагревают. При разложении лецитина образуется триметиламин, обнаруживаемый по посинению влажной лакмусовой бумажки, которую держат у отверстия тигля. Реакция идет бурно, иногда она сопровождается небольшой вспышкой. Сплав осторожно прокаливают до полного окисления. После охлаждения тигля серовато-белую золу растворяют в 10%-ном растворе азотной кислоты и в полученном растворе обнаруживают фосфорную кислоту с помощью молибдата аммония или магнезиальной смеси, для чего к 2 мл молибденового реактива прибавляют небольшими порциями испытуемый раствор. Смесь слегка нагревают. Образуется желто-зеленый осадок фосфоро-молибдата аммония:

$$12\,(NH_4)_2MoO_4 + 24HNO_3 \rightarrow 12H_2MoO_4 + 24NH_4NO_3$$
$$H_3PO_4 + 12H_2MoO_4 \rightarrow H_3PO_4 \cdot 12MoO_3 + 12H_2O$$
$$H_3PO_4 \cdot 12MoO_3 + 3NH_4NO_3 \rightarrow (NH_4)_3PO_4 \cdot 12MoO_3\downarrow + 3HNO_3$$
$$\overline{12\,(NH_4)_2MoO_4 + 21HNO_3 \rightarrow 21NH_4NO_3 + (NH_4)_3PO_4 \cdot 12MoO_3\downarrow + 12H_2O}$$

К 1 мл испытуемого раствора постепенно прибавляют концентрированный раствор аммиака до резкого запаха, после чего приливают равный объем магнезиальной смеси. При натирании стеклянной палочкой образуется мелко кристаллический осадок фосфата магний-аммония:

$$H_3PO_4 + NH_4OH + MgCl_2 \rightarrow MgNH_4PO_4\downarrow + 2HCl + H_2O$$

Обнаружение азота

(Работу проводят в вытяжном шкафу, надевают защитные очки).

В сухую пробирку помещают небольшое количество осадка лецитина, полученного в опыте (с. 267), и кусочек металлического натрия величиной с горошину, отжатого от керосина фильтроваль-

ной бумагой. Смесь осторожно нагревают на небольшом пламени до расплавления натрия, после чего нагревание продолжают до разложения вещества, сопровождающегося вспышкой. Нагревание продолжают еще 1—2 мин, доводя пробирку до слабо-красного каления. Раскаленную пробирку опускают в стакан с водой (около 5 мл). От быстрого охлаждения пробирка растрескивается, а ее содержимое растворяется в воде. Кусочки плава хорошо измельчают, смесь переливают в пробирку и нагревают до кипения.

К раствору прибавляют 2—3 капли 1%-ного раствора сульфата железа (II) и столько же хлорида железа (III). Смесь перемешивают и нагревают 1—2 мин, охлаждают и подкисляют 10%-ным раствором соляной кислоты. Выпадает синий осадок берлинской лазури. Если азота в исходном материале было мало, то жидкость приобретает зелено-синюю окраску и осадок выделяется лишь после стояния. Эта реакция основана на том, что при прокаливании испытуемого препарата с металлическим натрием происходит разложение азотсодержащего органического вещества с образованием цианида натрия. Цианид натрия дает с гидроксидом железа (II) гексациано-(II) феррат натрия. Последний с солями оксида железа (III) образует синий осадок берлинской лазури:

$$\text{Лецитин} + Na \xrightarrow{\text{прокаливание}} NaCN + \text{продукты распада}$$

$$2NaCN + FeSO_4 \rightarrow Fe(CN)_2 + Na_2SO_4$$

$$Fe(CN)_2 + 4NaCN \leftarrow Na_4[Fe(CN)_6]$$

$$3Na_4[Fe(CN)_6] + 4FeCl_3 \rightarrow \underset{\text{Берлинская лазурь}}{Fe_4[Fe(CN)_6]_3} + 12NaCl$$

ГИДРОЛИЗ ЛЕЦИТИНА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ В ГИДРОЛИЗАТЕ ГЛИЦЕРИНА, ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ХОЛИНА

При нагревании лецитина со щелочью происходит гидролитический распад его с образованием холина, высших жирных кислот и глицерина (см. учебник, с. 470).

Оборудование, реактивы. Баня водяная; пробирки стеклянные химические; воронка стеклянная; бумага фильтровальная; гидроксид натрия (10%-ный); соляная кислота (10%-ная); бумага лакмусовая (синяя и красная); гидросульфат калия.

Осадок лецитина, полученный в опыте (с. 267), переносят в пробирку, добавляют 2—3 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и кипятят в течение 5 мин. Происходит гидролиз лецитина.

О т к р ы т и е х о л и н а. При кипячении ощущается запах селедочного рассола, характерный для триметиламина, который образуется из холина. Триметиламин обнаруживают также по по-

синению влажной красной лакмусовой бумажки, которую держат у отверстия пробирки:

$$\left[\underset{\text{Холин}}{HO{-}CH_2{-}CH_2{-}\overset{+}{N}(CH_3)_3}\right]\overset{-}{OH}\xrightarrow{\text{Нагревание}}$$

$$\rightarrow \underset{\text{Триметиламин}}{N(CH_3)_3} + HO{-}CH_2{-}CH_2{-}OH$$

Открытие высших жирных кислот. К находящейся в пробирке жидкости добавляют 10%-ный раствор соляной кислоты до покраснения синей лакмусовой бумажки. В кислой среде из растворимых натриевых солей выделяются нерастворимые свободные жирные кислоты, всплывающие наверх. Их отфильтровывают, а фильтрат используют для следующей работы.

Открытие глицерина. К фильтрату (см. выше) добавляют по каплям 10%-ный раствор гидроксида натрия до нейтральной по лакмусу реакции и выпаривают досуха на водяной бане. Глицерин, находящийся в сухом остатке, открывают акролеиновой пробой (с. 258).

СТЕРИДЫ И СТЕРОЛЫ

Стеролы и стериды (см. учебник, с. 171—176) широко распространены в растительных и животных организмах. Одним из наиболее распространенных стеролов является холестерол, открытый впервые при исследовании желчных камней. Желчные камни на 90% состоят из холестерола. Сложные эфиры холестерола называют холестеридами. В холестеридах жирная кислота чаще всего представлена стеариновой, пальмитиновой или олеиновой.

В животном организме холестерол составляет 0,25—0,30% в сухом веществе. Больше всего холестерола содержится в нервной ткани, особенно в белом веществе головного мозга. В целом в мозговой ткани содержание его равняется 2—3% (на сырое вещество); в сером веществе — 0,9 — 1,4%, а в белом веществе оно достигает 4—5,3%. Очень высоким содержанием холестеридов отличается ланолин — очищенный жир овечьей шерсти.

Холестерол хорошо растворим в ряде органических растворителей. Лучшим растворителем для него является хлороформ. Органические растворители по степени растворимости в них холестерола располагаются в такой последовательности: хлороформ, серный эфир, горячий этиловый спирт, бензол, сероуглерод, толуол, ацетон. В воде он нерастворим, но легко набухает, образуя стойкую эмульсию, вследствие чего может удерживать огромное количество воды, превышающее его массу в 100 раз. При извлечении липидов из мозга или других тканей холестерол переходит в неомыляемую

фракцию, на которую щелочи не оказывают никакого действия. Холестерол не разрушается даже под влиянием концентрированных щелочей. Другие липиды, в частности жиры и фосфатиды, в этих условиях полностью расщепляются на компоненты и теряют присущие им природные свойства.

ВЫДЕЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРОЛА ИЗ МОЗГА

Оборудованне, реактнвы. Шкаф сушнльный; ступка (днаметр 110 мм) с пестнком (высота 110 мм); пластинка стеклянная (10×10 см); лопаточка деревянная; нож нлн скальпель; пробнрки стеклянные хнмическне; воронка стеклянная; бумага фнльтровальная; гнпс; хлороформ; мозг, нзмельченный в мясорубке.

Тщательно растирают в фарфоровой ступке 3—5 г мозга с 6—10 г гипса. Полученную густую массу размазывают деревянной лопаточкой по стеклянной пластинке и высушивают в сушильном шкафу при 60°С или над пламенем горелки (с. 268).

Сухую массу счищают ножом в сухую ступку, растирают и переносят в сухую пробирку. К сухому порошку в пробирке приливают 5—6 мл хлороформа и содержимое ее тщательно взбалтывают 5—10 мин. Полученный хлороформный экстракт отфильтровывают через сухой фильтр в сухую пробирку. Его используют для проведения цветных реакций на холестерол.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ХОЛЕСТЕРОЛ

Оборудованне, реактнвы. Пробнркн стеклянные химические; уксусная кнслота (ледяная); уксусный ангидрнд; формалин — серная кислота (1 мл формалина смешивают с 50 мл концентрнрованной серной кислоты); хлорнстый бензоил; хлорнд цннка; серная кислота (конц.); холестерол (0,1%-ный) в уксусной кнслоте (ледяной); хлороформиый экстракт холестерола, полученный в предыдущем опыте.

Реакция Шиффа

В пробирку наливают 1 мл хлороформного раствора холестерола, полученного в опыте (с. 272), и осторожно по стенке пробирки подслаивают 1 мл концентрированной серной кислоты. На границе двух жидкостей появляется кольцо красного цвета.

Реакция Сальковского

После проведения пробы Шиффа жидкость осторожно встряхивают, перемешивая содержимое пробирки. После отслаивания верхний слой жидкости окрашивается в красный цвет, нижний имеет желто-оранжевую окраску с зеленой флуоресценцией (жидкость в проходящем свете прозрачна и желто-красного цвета, в отраженном свете кажется мутной с зеленым оттенком). Если к нижнему слою добавить ледяной уксусной кислоты, то жидкость становится розово-красной, флуоресценция сохраняется.

Реакция Либермана — Бурхарда

В пробирку наливают 1—2 мл хлороформного экстракта холестерола, добавляют 10 капель уксусного ангидрида и 2 капли концентрированной серной кислоты. Жидкость хорошо взбалтывают и наблюдают образование сначала красной, затем красно-фиолетовой, фиолетовой, аметистово-синей, синей и, наконец, зеленой окраски. При незначительном содержании холестерола может сразу появиться зеленая окраска. Эта реакция положена в основу количественного определения холестерола.

Три вышеописанные реакции сходны друг с другом по природе химических превращений. Под действием серной кислоты происходят дегидратация и окисление холестерола. В результате этого две молекулы холестерола, потерявшие две молекулы воды, соединяются между собой по третьему атому углерода, образуя вещества, соответствующие суммарным формулам $C_{54}H_{86}$ и $C_{54}H_{88}$. Эти непредельные углеводороды с сопряженными двойными связями дают различные производные с серной кислотой и уксусным ангидридом. Указанные реакции характерны не только для холестерола; их дают и другие стеролы, а также холевая кислота:

H OH + HO H H H H H

$2H_2O, 2H$

Бихолестадиен (зеленый)

Реакция Витта

К 2 мл хлороформного раствора холестерола приливают равный объем смеси формалина с серной кислотой и взбалтывают. Раствор делится на два слоя: верхний — вишневого цвета и ниж-

ний — буро-красный с интенсивной зеленой флуоресценцией. Сливают верхний (хлороформный) слой в другую пробирку и прибавляют 2—3 капли уксусного ангидрида. Вишневая окраска переходит в синюю.

Реакция Чугаева

Работу проводят в вытяжном шкафу вследствие токсичности хлористого бензоила. Нагревают осторожно, так как реакция протекает бурно.

В пробирку наливают примерно 1 мл хлористого бензоила. Добавляют 5—10 капель раствора холестерола в уксусной кислоте и щепотку (0,1—0,2 г) хлорида цинка. Пробирку осторожно нагревают на небольшом пламени. Раствор окрашивается в малиновый цвет.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРОЛА

В основу количественного определения холестерола положена цветная реакция Либермана — Бурхарда (с серной кислотой и уксусным ангидридом). Интенсивность зеленого окрашивания пропорциональна концентрации холестерола.

Оборудование, реактивы. Фотоэлектроколорнметр; баня водяная; ступка (диаметр 90 мм) с пестиком (высота 90 мм); колба мериая с притертой пробкой на 25 мл; цнлиндр мерный на 25 мл; воронка стеклянная; бюретки с краиом на 25 мл (2 шт.); колба коническая на 25 мл; пнпетка с одной меткой на 10 мл; чашка выпарнвательная; цилиндры мерные с притертой пробкой на 10 мл; бумага фильтровальная; мозг, нзмельченный в мясорубке; хлороформ; спирто-эфирная смесь (3 : 1 по объему); серная кислота (ρ 1,84); уксусный ангидрид; стандартный раствор для определения холестерола (см. приложеине).

Навеску растертого головного мозга (около 100 мг) переносят в мерную колбочку на 25 мл с притертой пробкой, в которую предварительно наливают 15 мл спирто-эфирной смеси (3 : 1). После энергичного встряхивания колбу помещают в водяную баню при 50°С (*горелка должна быть потушена*). Смесь в колбе быстро закипает (*опасаться выброса!*). Ее кипятят 30 с, не давая жидкости бурно вскипать. После охлаждения в колбу добавляют спирто-эфирную смесь (3 : 1) до метки, содержимое колбы взбалтывают и фильтруют через складчатый фильтр. 10 мл фильтрата переносят в выпарительную чашку и выпаривают на нагретой заранее водяной бане досуха. (*Работу ведут под тягой, горелка под баней должна быть потушена.*) Остаток в чашке растворяют в 10 мл хлороформа (хлороформ наливают из бюретки, набирать его пипеткой ртом нельзя).

Для получения цветной реакции в мерный цилиндр на 10 мл с притертой пробкой берут 5 мл хлороформного раствора холестерола, прибавляют 1 мл уксусного ангидрида и 4 капли концентри-

рованной серной кислоты. Смесь перемешивают, доводят хлороформом до 10 мл, опять перемешивают и ставят в темное место при комнатной температуре на 25 мин для развития окраски.

Затем интенсивность зеленого окрашивания измеряют на фотоэлектроколориметре или на колориметре ФМ-1 при 656 нм против контроля, которым служит раствор, содержащий 5 мл хлороформа, 1 мл уксусного ангидрида и 4 капли серной кислоты, доведенный хлороформом до объема 10 мл.

Количество холестерола в пробе определяют с помощью калибровочной кривой. Калибровочную кривую строят по данным измерения экстинкции растворов холестерола различной концентрации (см. приложение), с которыми проводят те же операции, что и с испытуемым раствором. Метод позволяет определять массу холестерола от 0,05 до 0,5 мг. Расхождение между параллельными пробами не превышает 1—2%.

МИНЕРАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА И ИХ ОБМЕН

В состав всех одноклеточных и многоклеточных организмов, кроме белков, углеводов, нуклеиновых кислот, липидов, ферментов, витаминов и гормонов, входит обширная группа минеральных веществ. Они играют важную роль в построении их макро- и микроструктур и принимают активное участие в общем обмене веществ (см. учебник, с. 21—25 и 475—482).

КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ КОСТНОЙ ТКАНИ

В состав костной ткани входит вода (50%), органические (28%) и неорганические (22%) вещества. Среди последних бóльшую часть составляет фосфат кальция (85%) и в значительно меньших количествах содержится карбонат кальция (10%), фосфат магния (1,5%) и фторид кальция (0,3%). Минеральные вещества распределены в органическом веществе костей в виде тончайших включений.

Оборудование, реактивы. Колба коническая на 50 мл; цилиндр измерительный на 25 мл; пробирки стеклянные химические; воронка стеклянная; бумага фильтровальная; костная ткань; серная кислота (0,5%-ная); оксалат аммония (насыщ.); гидроксид аммония (конц.); молибденовый реактив (см. приложение).

В колбу помещают примерно 5 г костной ткани, приливают 25 мл 0,5%-ного раствора серной кислоты и оставляют на сутки. Неорганические вещества переходят в раствор.

Открытие ионов кальция. Отфильтровывают 3—4 мл вытяжки в пробирку и добавляют 3—4 капли насыщенного раствора оксалата аммония. Выпадает осадок оксалата кальция:

$$CaHPO_4 + (NH_4)_2C_2O_4 \rightarrow CaC_2O_4\downarrow + (NH_4)_2HPO_4$$

Открытие ионов магния. Оксалат кальция, полученный в предыдущем опыте, отделяют фильтрованием. К фильтра-

ту добавляют 3—4 капли концентрированного раствора аммиака. Выпадает осадок фосфата магний-аммония:

$$MgHPO_4 + NH_4OH \rightarrow MgNH_4PO_4\downarrow + H_2O$$

Открытие фосфорной кислоты. К нескольким миллилитрам профильтрованной вытяжки из костной ткани прибавляют 5—6 капель молибденового реактива и нагревают до кипения. Медленно образуется желтый кристаллический осадок фосфоромолибдата аммония:

$$12\,(NH_4)_2MoO_4 + H_3PO_4 + 21HNO_3 \rightarrow$$
$$\rightarrow (NH_4)_3PO_4 \cdot 12MoO_3 + 21NH_4NO_3 + 12H_2O$$

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗОЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЗОЛЫ В ЛИСТЬЯХ И ТРАВЯНИСТЫХ ОРГАНАХ РАСТЕНИЙ (ПО ЕРМАКОВУ)

Зола — это остаток, получаемый после сжигания и прокаливания природных материалов. При сжигании вещества биологического происхождения на воздухе углерод, водород и частично кислород переходят в углекислый газ и пары воды, которые улетучиваются. Удаляется также и азот. В виде золы остаются нелетучие оксиды химических элементов: Ca, Mg, Si, Al, Fe, P, K, Na и др. Для обеспечения свободного доступа воздуха сжигание проводят медленно, причем часто добавляют разрыхляющие навеску вещества (ацетат кальция или карбонат магния, смесь равных частей спирта и глицерина и т. п.). При прокаливании материала часть соединений фосфора, серы, галогенов и щелочных металлов улетучивается. Поэтому для количественного определения этих элементов применяют так называемое мокрое сжигание, т. е. сжигание в серной или азотной кислоте, а иногда в их смеси.

Суммарное количество золы в составе биологических объектов после сжигания определяют гравиметрическим методом.

Оборудование, реактивы. Печь муфельная; щипцы тигельные; весы аналитические; эксикатор без крана с хлоридом кальция; тигель высокий (диаметр 45 мм) с крышкой; стаканчик для взвешивания (бюкс); палочки стеклянные (толщина 2—2,5 мм); бюретка прямая с краном на 10 мл; ацетат магния в этаноле (96%-ном) (см. приложение).

На аналитических весах отвешивают 1,5—2 г измельченных сухих листьев в фарфоровый тигель с крышкой, заранее прокаленный и доведенный до постоянной массы. Для ускорения озоления и предотвращения сплавления золы навеску в тигле смешивают тонкой стеклянной палочкой с 3 мл (из бюретки) спиртового раствора ацетата магния, содержащего примерно 3 мг оксида магния в 1 мл раствора. После этого тигель осторожно нагревают пламенем горелки; при этом иногда наблюдается сильное вспучивание. После

образования корки на поверхности сжигаемой навески тигель прикрывают крышкой и ставят в муфельную печь с открытой дверкой для большего доступа воздуха. Нагрев печи в первое время сжигания не должен быть сильным, и навеска не должна воспламеняться. Через 5—10 мин, после того как тигель перестал дымить, нагрев муфельной печи усиливают, постепенно доводя его до красного каления. Для озоления достаточно нагревания в течение 45—60 мин. Полученная зола может иметь самые разнообразные цвета и оттенки в зависимости от анализируемого материала. Часто она получается почти белого цвета, иногда слегка сероватого, буро-красного (от оксида железа (III), зеленоватого (от оксида марганца) и т. д.

После прокаливания тигель вынимают из муфельной печи и ставят в эксикатор. После охлаждения в течение 45 мин тигли взвешивают на аналитических весах. Для поправки на внесенный ацетат магния в прокаленный и взвешенный тигель наливают из бюретки 5 мл его спиртового раствора, выпаривают, прокаливают и подсчитывают, какое количество оксида магния содержится в 1 мл приготовленного раствора.

Расчет содержания золы в навеске проводят по уравнению:

$$C = \frac{(a-b)\cdot 100}{p},$$

где C — массовая доля (в %); a — масса золы (в г); b — поправка на содержание оксида магния (в г); p — навеска листьев (в г).

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРЕМНИЕВОЙ КИСЛОТЫ В ЗОЛЕ (ПО ЕРМАКОВУ)

Оборудование, реактивы. Шкаф сушильный; весы аналитические; печь муфельная; эксикаторы (без крана) с хлоридом кальция; щипцы тигельные; тигли фарфоровые высокие; баня водяная; стаканчики для взвешивания (бюксы); колбы конические на 50—100 мл; воронка стеклянная; чашка выпарительная на 50 мл; цилиндр измерительный на 50 мл; палочка стеклянная; пластинка стеклянная (10×10 см); бумага фильтровальная; азотная кислота (конц.); соляная кислота (конц.); смесь азотной (конц.) и соляной (конц.) кислот (1 : 1); пероксид водорода (30%-ный); роданид аммония (5%-ный).

Озоляют от 10 до 30 г грубо измельченного материала. Озоление проводят в больших фарфоровых тиглях. Берут навеску, как указано в предыдущей работе, и на небольшом пламени горелки обугливают материал, прикрыв тигель крышкой. Затем пламя горелки усиливают или помещают тигель в муфельную печь.

Для ускорения сжигания к обугленному материалу добавляют 5 мл 30%-ного раствора пероксида водорода или азотной кислоты (ρ 1,4 г/см³). Если необходимо, материал обрабатывают окислителями несколько раз. Перед добавлением окислителя тигель охлаждают, после добавления окислителя нагревают его вначале при 80°—100°С, а затем нагрев муфельной печи усиливают и доводят ее до красного каления, при котором тигель держат не менее

30 мин. После озоления тигель охлаждают в эксикаторе с хлоридом кальция в течение 45 мин и взвешивают для определения количества золы.

Золу переносят в фарфоровую чашку, куда приливают 50 мл смеси концентрированных соляной и азотной кислот (1 : 1). Если тигель достаточно велик, растворение ведут прямо в тигле. Содержимое тщательно перемешивают, чашку или тигель накрывают стеклом и нагревают на водяной бане около 1 ч. Затем стекло снимают и содержимое чашки выпаривают досуха. Остаток сушат в сушильном шкафу при температуре не выше 120°С (во избежание перевода кремниевой кислоты в растворимое состояние), растворяют в кипящей воде, подкисленной соляной кислотой, и отфильтровывают через плотный фильтр. Осадок на фильтре, состоящий из кремниевой кислоты, промывают горячей водой, подкисленной соляной кислотой, до исчезновения в промывных водах реакции на железо (проба с роданидом аммония). Фильтр сжигают в предварительно взвешенном тигле, прокаливают до постоянной массы (2—3 ч) и взвешивают. Процентное содержание оксида кремния SiO_2 в сухой навеске и в золе вычисляют по формулам:

$$C_1 = \frac{a_1 \cdot 100}{a} \text{(в навеске) и } C_2 = \frac{a_1 \cdot 100}{a_2} \text{ (в золе),}$$

где C_1 — массовая доля (в %) кремниевой кислоты в навеске; C_2 — массовая доля (в %) кремниевой кислоты в золе; a — масса сухого материала (в г); a_1 — масса кремниевой кислоты (в г); a_2 — масса золы (в г).

Например, при анализе картофеля навеска сухого материала для озоления была 30 г; после озоления получено 1,2734 г золы; масса кремниевой кислоты равна 0,0605 г, что составляет 0,20% в пересчете на сухую навеску, или 4,75% от массы золы.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ (ПО ДЕ ВААРДУ)

Кальций, содержащийся в виде солей в сыворотке крови, переводят в оксалат. При растворении последнего в серной кислоте освобождается эквивалентное количество щавелевой кислоты, которую оттитровывают раствором перманганата калия:

$$CaCl_2 + (NH_4)_2C_2O_4 \rightarrow CaC_2O_4\downarrow + 2NH_4Cl$$

$$CaC_2O_4 + H_2SO_4 \rightarrow CaSO_4\downarrow + H_2C_2O_4$$

$$2KMnO_4 + 5H_2C_2O_4 + 3H_2SO_4 \rightarrow 2MnSO_4 + K_2SO_4 + 10CO_2 + 8H_2O$$

Оборудование, реактивы. Центрифуга; баня водяная; микробюретка на 2 мл; пипетки с одной меткой на 1 мл (4 шт.); пробирки стеклянные центрифужные; колбы конические на 25 мл (2 шт.); аммиак (2%-ный); оксалат аммония (насыщ.); серная кислота (5%-ная); перманганат калия (0,01 н.).

В одну центрифужную пробирку вносят 1 мл негемолизированной сыворотки крови, в другую — 1 мл бидистиллированной воды (контроль). В обе пробирки наливают по 1 мл насыщенного раствора оксалата аммония и оставляют стоять на 1 ч. Затем пробы центрифугируют при 3000 *g* в течение 10 мин. Сливают жидкость, опрокидывая пробирку, или отсасывают жидкость стеклянным капилляром, кончик которого несколько загнут кверху. Наливают в пробирки по 2 мл 2%-ного раствора аммиака, взмучивают осадок и опять центрифугируют. Осадок оксалата кальция легко растворим в минеральных кислотах и нерастворим в слабощелочной среде. Поэтому избыток оксалата аммония удаляют многократной промывкой 2%-ным раствором аммиака (не менее 3 раз). Затем добавляют в каждую пробирку по 1 мл 5%-ного раствора серной кислоты. Осадок перемешивают стеклянной палочкой, добиваясь полного его растворения. Количественно переносят их содержимое в колбы на 25 мл подогретой 5%-ной серной кислотой, а горячий раствор титруют из микробюретки 0,01 н. раствором перманганата калия до появления слабо-розовой окраски.

Содержание кальция рассчитывают по формуле:

$$C = 0{,}2 \cdot (V_1 - V_2) \cdot 100,$$

где C — содержание кальция (в мг %); 0,2 — масса кальция (мг), соответствующая 1 мл 0,01 н. раствора $KMnO_4$; V_1 — объем (в мл) 0,01 н. раствора $KMnO_4$, израсходованного на титрование опытной пробы; V_2 — объем (в мл) 0,01 н. раствора $KMnO_4$, израсходованного на титрование контрольной пробы.

В норме содержание кальция в сыворотке крови составляет от 9 до 11 мг%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КАЛЬЦИЯ И ФОСФОРА В МОЛОКЕ

Молоко — важный источник кальция и фосфора. Кальций и фосфор в нем находятся в оптимальном для питания человека соотношении (1,5 : 1) и поэтому легко и быстро усваиваются. В женском молоке содержится в среднем 34 мг% кальция и 15 мг% фосфора, в коровьем — 140 мг% кальция и 80 мг% фосфора. Определение содержания кальция в молоке проводят по методу де Ваарда, фосфора — по методу Фиске — Суббароу.

Оборудование, реактивы, необходимые для определения кальция по методу де Ваарда (с. 278) и фосфора по методу Фиске — Суббароу (с. 179)

В одну пробирку наливают 1 мл разведенного в 10 раз молока, в другую — 1 мл воды. В обе пробирки добавляют по 0,5 мл насыщенного раствора оксалата аммония и в остальном поступают так же, как описано в приведенной выше прописи (с. 279).

Содержание кальция в молоке (мг%) вычисляют по формуле:

$$C = \frac{0,2(V_1 - V_2) \cdot 100}{0,1},$$

где 0,1 — величина, обратная степени разведения (остальные обозначения см. в предыдущей работе).

В большую пробирку из тугоплавкого стекла наливают 0,5 мл молока и 1,5 мл 10 н. раствора серной кислоты. Одновременно ставят контрольный опыт с 0,5 мл воды и 1,5 мл 10 н. раствора серной кислоты. Минерализацию и определение фосфора проводят по прописи, указанной на странице 179.

Полученные бесцветные минерализаты количественно переносят в мерные колбы на 50 мл, нейтрализуют раствором щелочи по фенолфталеину и доводят до метки водой. Для определения фосфора берут 2 мл нейтрализованного раствора. В качестве эталона сравнения берут 1 мл стандартного раствора. Содержание фосфора в исследуемом образце вычисляют по формуле:

$$C = 125 \cdot \frac{E}{E_1},$$

где C — содержание фосфора (в мг%); E — оптическая плотность исследуемого раствора; F_1 — оптическая плотность стандартного раствора; 125 — коэффициент пересчета (в мг%) с учетом разведения.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ (ПО КРАМЕРУ — ТИСДАЛЛЮ)

Калий осаждают из сыворотки крови кобальтнитритом натрия. Полученный осадок отделяют центрифугированием и титруют перманганатом калия в присутствии серной кислоты.

Оборудование, реактивы. Центрифуга; секундомер; баня водяная; бюретка прямая с краном на 25 мл (2 шт.); пипетки градуированные на 1 мл (4 шт) и на 5 мл; кобальтнитрит натрия (см. приложение); перманганат калия (0,01 н.); щавелевая кислота (0,01 н.); серная кислота (20%-ная); стандартный раствор хлорида калия (0,3814 г KCl растворяют и доводят дистиллированной водой до 1 л; 1 мл раствора содержит 0,2 мг калия).

В центрифужную пробирку наливают 0,5 мл сыворотки крови и прибавляют по каплям, все время взбалтывая, 1 мл кобальтнитрита натрия. Оставляют на 45 мин, а затем прибавляют 3 мл бидистиллированной воды и центрифугируют при 5000 g в течение 10—15 мин. Жидкость сливают, приливают 5 мл бидистиллированной воды и опять центрифугируют. Эту операцию проделывают до тех пор, пока вода над осадком не станет бесцветной. По завершении промывания прибавляют из бюретки 2,5 мл 0,01 н. раствора перманганата калия, а пипеткой — 1 мл 20%-ного раствора серной кислоты; пробирку помещают в кипящую водяную баню на 90 с, все время перемешивая содержимое пробирки. Затем из другой бюретки добавляют 1 мл раствора щавелевой кислоты. Если жид-

кость не обесцветилась, то приливают еще 1 мл щавелевой кислоты. Обесцвеченный раствор титруют 0,01 н. раствором перманганата калия до слабо-розовой окраски.

Содержание калия (в мг%) определяют по следующей формуле:

$$C = [\,(V - V_1) - 0{,}06] \cdot a \cdot 200,$$

где V — весь объем израсходованного 0,01 н. раствора перманганата калия (2,5 мл + объем (в мл), пошедший на титрование); V_1 — количество (в мл) 0,01 н. раствора щавелевой кислоты; 0,06 — объем (в мл) 0,01 н. раствора перманганата калия, расходуемого для получения раствора, имеющего слабо-розовую окраску; 200 — коэффициент для пересчета (в мг%) с учетом разведения; a — масса (в мг) калия, которому соответствует 1 мл 0,01 н. раствора перманганата калия.

Величину a устанавливают опытным путем. Для этого 0,5 мл стандартного раствора хлорида калия (содержащего 0,1 мг калия) обрабатывают и титруют так, как было описано выше. Допустим, что израсходовано 1,5 мл 0,01 н. раствора перманганата калия, тогда 1 мл этого раствора соответствует (0,1 : 1,5) 0,067 мг калия.

В норме содержание калия в сыворотке крови составляет 17,5–22,5 мг%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖЕЛЕЗА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ РОДАНИДНЫМ МЕТОДОМ

Метод основан на фотометрическом определении интенсивности красного окрашивания, которое появляется при взаимодействии иона железа со степенью окисления +3 с роданидом калия. Биологический материал предварительно озоляют мокрым путем.

Оборудование, реактивы. Фотоэлектроколориметр; воронка делительная; пробирки стеклянные химические из тугоплавкого стекла; пипетки градуированные на 2 и 5 мл; серная кислота (10 н.); пергидроль; перманганат калия (0,04%-ный); роданид калия (20%-ный); изоамиловый спирт; аммиак (конц.); стандартный раствор железа (железную проволоку растворяют в дважды перегнанной соляной кислоте с добавлением нескольких капель дважды перегнанной азотной кислоты; сначала готовят раствор, содержащий 100 мг железа, из него готовят рабочие растворы). Применяемые реактивы должны быть свободны от следов железа.

В качестве испытуемых препаратов берут биологические жидкости (молоко — 5 мл, сыворотку крови — 2 мл, сухие ткани растений или животных — от 0,1 до 0,2 г). Образец предварительно озоляют в присутствии серной кислоты и пергидроля (с. 179). После охлаждения в пробирку из тугоплавкого стекла, в которой вели озоление, прибавляют 5 мл воды, энергично перемешивают содержимое и фильтруют в делительную воронку из стекла пирекс. Пробирку и фильтр промывают водой 3 раза, доводя общий объем фильтрата до 20 мл. Прибавляют 1 каплю 0,04%-ного раствора перманганата калия, размешивают и, если окраска исчезает, до-

бавляют еще каплю раствора перманганата. После этого прибавляют 15 мл изоамилового спирта и 5 мл 20%-ного раствора роданида калия. Смесь встряхивают, спиртовой слой сливают в кювету фотоэлектроколориметра и ведут отсчет против чистого изоамилового спирта при 490 нм.

Содержание железа определяют по стандартной кривой, которую строят из определений железа в серии стандартных растворов (содержащих 5, 10, 25 и 50 мкг/мл железа), причем обязательно ставят холостой опыт на реактивы. С этой целью в пробирку вносят 1,5 мл 10 н. серной кислоты, нагревают на песочной бане и добавляют столько же пергидроля, сколько было взято для опыта. Полученную смесь частично нейтрализуют концентрированным аммиаком, прибавляя его в количестве, достаточном для нейтрализации половины взятой в опыт серной кислоты. К полученному раствору добавляют определенный стандартный раствор и обрабатывают пробу описанным выше способом. Содержание железа (в мг%) в биологическом материале вычисляют по формуле:

$$C = \frac{a \cdot 100}{b},$$

где a — содержание железа в испытуемом растворе, найденное по калибровочной кривой (в мг); b — объем биологической жидкости (в мл) или масса ткани (в г), взятые для исследования.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕДИ

Медь определяют с помощью диэтилдитиофосфатов, которые образуют с медью осадок, растворимый в органических реагентах. Растворы диэтилдитиофосфатов меди окрашены в интенсивный желто-оранжевый цвет. Диэтилдитиофосфат меди переходит в органическую фазу при слабощелочной, нейтральной и кислой реакциях среды. Диэтилдитиофосфат никеля реагирует с медью, как и все тиофосфаты, с образованием осадка, растворимого в органических жидкостях. Большая избирательная способность данного реагента по отношению к меди позволяет проводить определение меди без дополнительного ее выделения.

Оборудоваиие, реактивы. Фотоэлектроколориметр; муфельиая печь; воронка делительная иа 100 мл; колбы мерные иа 25 и 1000 мл; пробирки стекляииые химические; пипетки градуированиые иа 1, 2 и 10 мл; воронка стекляиная (диаметр 3—4 см); тигель высокий (диаметр 55 мм); сульфат меди, трижды перекристаллизоваииый из воды; диэтилдитиофосфат никеля (0,005 М); углерод четыреххлористый (химически чистый, перегиаииый); соляная кислота (ρ 1,19 г/см^3); серная кислота (ρ 1,84 г/см^3).

Навеску в 10—20 г растительного материала помещают в тигель и прокаливают в муфельной печи при 550°C до полного озоления. Животный материал чаще всего минерализуют смесью азотной и серной кислот (с. 71) в колбах Кьельдаля.

Золу растворяют в смеси соляной и серной концентрированных кислот (3 : 1), разбавляют водой и количественно переносят в мерную колбу на 25 мл. 2 мл этого раствора (опытная проба, в контрольной пробе — 2 мл воды) помещают в делительную воронку на 100 мл, приливают 10 мл четыреххлористого углерода и 2 мл 0,005 М водного раствора диэтилдитиофосфата никеля. Последний реактив вводят медленно, по каплям при постоянном помешивании раствора. Образовавшийся диэтилдитиофосфат меди немедленно экстрагируют путем энергичного встряхивания воронки в течение 1 мин. Слой четыреххлористого углерода сливают в сухую пробирку и фильтруют через маленький беззольный фильтр в кювету фотоэлектроколориметра. Оптическую плотность окрашенного раствора измеряют, используя синий светофильтр (465 нм) в кювете толщиной 1 см. Содержание меди в испытуемых пробах рассчитывают по стандартной кривой.

Стандартный раствор меди готовят следующим образом: 3,9330 г химически чистого, перекристаллизованного медного купороса растворяют в 1 л дистиллированной воды с добавлением 10 мл 6 н. раствора серной кислоты. Такой раствор содержит 1 мг меди в 1 мл 10 мл этого раствора разбавляют водой до 1 л и получают стандартный раствор с содержанием 0,01 мг меди в 1 мл. Последний раствор разбавляют еще в 10 раз, получая рабочий стандартный раствор, содержащий 1 мкг меди в 1 мл. Из него берут для анализа пробы, содержащие 0,5, 1,5, 2, 2,5 и 3 мкг меди.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИНКА

Метод основан на получении в слабощелочной или нейтральной среде дитизоната цинка, растворяющегося в четыреххлористом углероде или хлороформе; раствор имеет ярко-красную окраску. Крайне важно, чтобы все применяемые реактивы не содержали цинка. При обнаружении в них цинка реактивы очищают перегонкой или обрабатывают раствором дитизона в чистом четыреххлористом углероде для освобождения их от загрязнения цинком. Стеклянную посуду (из стекла пирекс, кварца), предназначенную для хранения аммиака и цитрата калия, парафинируют. Недопустимо применение каучуковых пробок. Растворы готовят на дважды перегнанной воде.

Оборудование, реактивы. Фотоэлектроколориметр; воронки делительные на 50—100 мл; пробирки градуированные на 10 мл; цилиндр мерный на 100 мл; пипетки градуированные на 1 и 5 мл; аммиак (0,01 н.); цитрат калия или натрия (10%-ный); соляная кислота (0,02 н.); диэтилдитиокарбамат натрия (0,2%-ный, свежеприготовленный); четыреххлористый углерод (очищенный и перегнанный); хлороформ (тщательно очищенный); дифенилтиокарбазон (дитизон, 0,12%-ный); тимоловая синь (0,1%-ная в 20%-ном этаноле); фенолфталеин (1%-ный); исходный стандартный раствор цинка (0,1 г химически чистого металлического цинка растворяют в 50 мл воды и 1 мл концентрированной серной кислоты; по растворении цинка раствор доводят водой до 1 л); разбавленный стандартный раствор цинка (5 мл исходного стандартного раствора цинка помещают в мерную колбу на 500 мл и доводят водой до метки; 1 мл такого раствора содержит 1 мкг цинка).

Озоление растительного и животного материала проводят так, как описано выше (с. 282).

Для определения цинка в исследуемом растворе берут такой объем последнего, чтобы содержание цинка составляло от 0,1 до 1 мг. Этот раствор помещают в делительную воронку с притертой пробкой на 50—100 мл, прибавляют 5 мл 10%-ного раствора цитрата калия или натрия (для связывания железа, алюминия и других катионов) и 1—2 капли тимолового синего. Затем приливают соляную кислоту до окрашивания раствора в красный цвет и нейтрализуют его разбавленным раствором аммиака (1 : 10), добиваясь ослабления красной окраски, но не доводя ее до желтой.

Для извлечения меди прибавляют 3—5 мл раствора дитизона и четыреххлористого углерода и делительную воронку встряхивают в течение 5 мин. Окрашенный нижний слой сливают и отбрасывают. В воронку приливают 3—5 мл раствора дитизона и после встряхивания отделяют и снова отбрасывают нижний слой. Эта операция повторяется до тех пор, пока раствор дитизона не перестанет изменять свою окраску. После этого к раствору прибавляют 5 мл 10%-ного раствора цитрата калия, 1—2 капли 1%-ного раствора фенолфталеина и раствор нейтрализуют разбавленным аммиаком до слабо-розового окрашивания. Добавляют 3—5 мл раствора дитизона и встряхивают 2 мин. Окрашенный слой четыреххлористого углерода, содержащий дитизонат цинка, переносят в другую чистую делительную воронку на 100 мл. К исследуемому раствору снова прибавляют 3—5 мл раствора дитизона и извлекают цинк. Подобное извлечение повторяют до тех пор, пока дитизон не перестанет менять свою окраску. К полученным экстрактам дитизоната цинка прибавляют 50 мл 0,02 н. раствора соляной кислоты и делительную воронку встряхивают 2—4 мин. При этом дитизонат цинка переходит в водную фазу. К солянокислому водному раствору прибавляют несколько раз по 0,5—1,0 мл четыреххлористого углерода и после встряхивания каждый раз нижний слой отделяют и отбрасывают.

Далее приступают к последнему извлечению цинка дитизоном, происходящему в присутствии диэтилдитиокарбамата натрия, связывающего Pb, Cd и другие элементы в более устойчивые комплексы, нежели соответствующие комплексы с дитизоном. К полученному солянокислому раствору прибавляют 5 мл 10%-ного раствора цитрата калия, 1—2 капли 1 %-ного раствора фенолфталеина и раствор нейтрализуют гидроксидом аммония до получения слабо-розовой окраски. Затем прибавляют 10 мл раствора диэтилдитиокарбамата натрия, 3—5 мл раствора дитизона в четыреххлористом углероде и встряхивают 2 мин. Нижний слой отделяют в чистую делительную воронку на 50 мл. Извлечение цинка раствором дитизона повторяют еще 1—2 раза. Все экстракты собирают в делительную воронку и прибавляют к ним 25 мл 0,01 н. раствора гидроксида аммония. После этого нижний слой отделяют и спускают

в градуированную пробирку на 10 мл с притертой пробкой. К раствору цинка прибавляют чистый четыреххлористый углерод до метки и встряхивают 10 раз. Через 10 —15 мин фотометрируют против чистого четыреххлористого углерода при зеленом светофильтре (530 нм).

Содержание цинка определяют по стандартной кривой. Для получения стандартной кривой в делительные воронки наливают последовательно 1, 2, 3 и 4 мл разбавленного стандартного раствора цинка, прибавляют воду до 5 мл, затем 5 мл 10%-ного цитрата калия, 1—2 капли 1%-ного раствора фенолфталеина и обработку ведут так, как описано выше. Содержание цинка (в мг%) в биологическом материале вычисляют по формуле:

$$C = \frac{a \cdot 100}{b},$$

где a — масса цинка в испытуемом растворе, найденная по калибровочной кривой (в мг); b — масса ткани (в г), взятая для исследования.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАРГАНЦА ПЕРСУЛЬФАТНЫМ МЕТОДОМ

Персульфат аммония в кислой среде в присутствии ионов серебра окисляет Mn^{+2} до $(MnO_4)^-$. Катализатором реакции служит нитрат серебра, который образует пероксид Ag_2O_2 и препятствует образованию осадка оксида марганца (IV).

Оборудование, реактивы. Фотоэлектроколориметр; колбы мерные на 50 мл; стаканы стеклянные лабораторные высокие с носиком на 100 мл; пипетки градуированные на 1, 5 и 10 мл; серная кислота (конц.); фосфорная кислота (конц.); нитрат серебра (2%-ный), хранят в темноте; персульфат аммония (10%-ный), свежеприготовленный; сульфит натрия (10%-ный); щавелевая кислота; стандартный раствор марганца (см. приложение); вода, содержащая окислитель (к 100 мл воды прибавляют 3 мл концентрированной серной кислоты, 1 мл 2%-ного раствора нитрата серебра и 5 мл 10%-ного персульфата аммония; полученный раствор кипятят, пока не прекратится выделение пузырьков газа).

5—10 г растительных или животных тканей подвергают либо сухому, либо мокрому (смесью, состоящей из азотной и серной кислот) сжиганию (с. 276, 282). Полученный остаток в результате сухого озоления растворяют в 2—3 мл серной кислоты, разбавляют водой и переносят в колбу на 100 мл. Минерализат, полученный в результате мокрого сжигания, переносят количественно в мерную колбу на 100 мл и доводят дистиллированной водой до метки.

К 10 мл испытуемого раствора в химическом стакане добавляют 2 мл концентрированной серной кислоты и 2 мл концентрированной фосфорной кислоты. Раствор доводят до 20 мл водой, а затем добавляют к нему 1 мл 2%-ного раствора нитрата серебра и 5 мл 10%-ного раствора персульфата аммония. После этого для окисления марганца и разложения избытка персульфата аммония раствор кипятят в течение 3—4 мин. После охлаждения раствор коли-

чественно переносят в мерную колбу на 50 мл и доводят до метки водой, содержащей окислитель. Полученный раствор фотометрируют на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром (530 нм) в кювете толщиной 1 см.

Содержание марганца определяют по стандартной кривой. Для построения стандартной кривой в пять химических стаканов объемом 100 мл вносят, кроме первого, 1, 2, 3 и 4 мл стандартного раствора марганца, по 20 мл дистиллированной воды и реактивы, как описано выше. После кипячения и охлаждения растворы количественно переносят водой, содержащей окислитель, в 50 мл мерные колбы и доводят до метки. Растворы содержат марганец в количестве 0, 2, 4, 6 и 8 мкг/мл. Содержание марганца (в мкг %) в биологическом материале вычисляют по формуле:

$$C = \frac{a \cdot 1000}{b},$$

где a — масса марганца в испытуемом растворе, найденная по калибровочной кривой (в мкг); b — масса ткани (в г), взятая для исследования; 1000 — коэффициент для пересчета (в мкг %) с учетом разведения.

ГОРМОНЫ

В настоящее время гормоны рассматривают как вещества, вырабатываемые одними группами клеток для оказания влияния на другие группы клеток посредством регуляции и интеграции обмена веществ в них. В связи с этим понятием «гормоноиды» утрачивают свое значение (см. учебник, с. 489 и др.). Совершенствуется и становится ведущей химическая классификация гормонов.

Осуществлен химический синтез многих гормонов, в том числе и некоторых сложнейших, таких, как инсулин, и их многочисленных дериватов, находящих все большее практическое применение в медицине (производные стероидных гормонов, простагландины и др.) и сельском хозяйстве (аналоги ювенильного гормона насекомых). Выделены и изучены простагландины — новый класс гормонов, являющихся производными полиеновых кислот. Получены из гипоталамуса, а также синтезированы многочисленные релизинг-факторы, управляющие биосинтезом многих гормонов и являющиеся, таким образом, гормонами гормонов.

В связи с этим знакомство с качественными реакциями на некоторые гормоны и методами их количественного определения имеет большое значение.

ГОРМОНЫ ПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ИНСУЛИН

Оборудование, реактивы. Штатив лабораторный с пробирками стеклянными химическими; раствор инсулина (в ампулах); гидроксид натрия (0.1%-ный); уксусная кислота (0,5%-ная); реактивы для проведения цветных реакций на белки (с. 61).

Реакция с разбавленным раствором гидроксида натрия

К 10—15 каплям раствора инсулина добавляют по каплям 0,1%-ный раствор гидроксида натрия до выпадения хлопьевидного осадка, который растворяется при подкислении 0,5%-ным раствором уксусной кислоты до pH 2,5—3,5.

Реакции, свидетельствующие о белковой природе инсулина

С раствором инсулина проделывают реакции, доказывающие его белковую природу: биуретовую (с. 63), Миллона (с. 65) и др.

СТЕРОИДНЫЕ ГОРМОНЫ

Женские половые гормоны (фолликулин, эстрадиол и эстриол) содержат фенольное кольцо, в связи с чем они дают ряд реакций, характерных для фенолов.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ФОЛЛИКУЛИН (ЭСТРОН)

Оборудование, реактивы. Баня водяная; воронка делительная; штатив лабораторный с пробирками стеклянными химическими; гидроксид натрия (30%-ный); м-динитробензол (2%-ный спиртовой); серная кислота (конц.); реактив Фолина (см. приложение); диазореактив (см. приложение); карбонат натрия (10%-ный); спиртовой раствор фолликулина (в делительную воронку наливают 100 мл этанола и масляный раствор фолликулина из 10 ампул; фолликулин экстрагируют спиртом при встряхивании и слоям дают разделиться; нижний, масляный слой отбрасывают, верхний, спиртовой используют для работы).

Диазореакция

К 3 мл спиртового раствора фолликулина добавляют 2 мл 10%-ного раствора карбоната натрия и 2—3 мл диазореактива. Постепенно возникает бледно-желтое окрашивание.

Реакция с концентрированной серной кислотой

В пробирку берут 1 мл спиртового раствора фолликулина и помещают ее в кипящую водяную баню на 5—10 мин для испарения спирта. К оставшемуся в пробирке фолликулину добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты и пробирку вновь помещают в кипящую водяную баню на 5—10 мин. Жидкость в пробирке окрашивается в соломенно-желтый цвет, переходящий при нагревании в оранжевый и имеющий зеленую флюоресценцию.

Образование фенолята фолликулина

В две сухие пробирки приливают по 0,5 мл раствора фолликулина. В первую добавляют 1 мл воды и отмечают образование эмульсии фолликулина. Во вторую добавляют такое же количество 30%-ного раствора гидроксида натрия — помутнения не возникает, так как в щелочной среде происходит образование растворимого фенолята фолликулина.

Реакция на фенольную группу

К 2 мл раствора фолликулина добавляют 1 мл 30%-ного раствора гидроксида натрия и 1 мл реактива Фолина. Возникает синее окрашивание, характерное для фенольной группы.

Реакция на 17-кетогруппу

В сухую пробирку вносят 1 мл раствора фолликулина, 1 мл 30%-ного раствора гидроксида натрия и 1 мл 2%-ного спиртового раствора *м*-динитробензола. Спустя 5—8 мин развивается красное окрашивание.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ПРОИЗВОДНЫЕ КОРТИКОСТЕРОНА

Кортикостерон (см. учебник, с. 492) не содержит фенольного ядра и поэтому не дает реакций, свойственных эстрону. Однако он и его дериваты обогащены кето- и оксигруппами, по которым осуществляются химические реакции, используемые для качественных проб на эту группу стероидных гормонов.

Качественные реакции на 11-дегидро-17-оксикортикостерон (кортизон)

Оборудование, реактивы. Баня водяная; пипетки с одной меткой на 1 мл (2 шт.); штатив лабораторный с пробирками стеклянными химическими; раствор сернокислого фенилгидразина (0,1 г фенилгидразина растворяют в 100 мл охлажденной смеси из равных объемов концентрированной серной кислоты и воды; раствор готовят перед употреблением); готовый препарат «кортизонацетат»; метиловый спирт; реактив Фелинга (см. приложение).

Реакция с сернокислым фенилгидразином

1 мг кортизон-ацетата растворяют в 1 мл метилового спирта, прибавляют 5 мл раствора сернокислого фенилгидразина и нагревают на водяной бане. Спустя несколько минут появляется желтое окрашивание. Окраска обусловлена образованием фенилгидразона, а затем озазона за счет карбонильных групп кортизона.

Реакция с реактивом Фелинга

10 мг кортизон-ацетата растворяют в 1 мл метилового спирта, прибавляют 1 мл жидкости Фелинга и нагревают на водяной бане. Выпадает красновато-оранжевый осадок оксида меди (I).

Качественная реакция на 11-дезоксикортикостерон

Оборудование, реактивы. Пробирки стеклянные химические; этиловый спирт (96%-ный); серная кислота (конц.); масляный раствор дезоксикортикостерон-ацетата.

В пробирку вносят 1 каплю масляного раствора дезоксикортикостерон-ацетата, 3—4 капли спирта и столько же серной кислоты. Нагревают содержимое пробирки до кипения, затем охлаждают. После охлаждения добавляют еще 15 капель серной кислоты и опять нагревают. Появляется синяя окраска, дающая красную флюоресценцию.

ГОРМОНЫ ИНОЙ ПРИРОДЫ

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ТИРОКСИН

Тироксин можно обнаружить в препарате тиреоидина, получаемом из обезжиренной и высушенной щитовидной железы крупного рогатого скота. Обнаружение тироксина ведут, отщепляя от него с помощью кислотного гидролиза иодоводородную кислоту и переводя ее в свободный иод, который, будучи извлечен хлороформом, придает последнему фиолетовую окраску.

Оборудование, реактивы. Азотная кислота (конц.); иодат калия (1%-ный); хлороформ, препарат тиреоидина.

В пробирку вносят полтаблетки тиреоидина и 10 капель концентрированной азотной кислоты. Гидролиз осуществляют при осторожном (во избежание вспенивания) нагревании в течение 1—2 мин. По истечении указанного времени в пробирку добавляют 20 капель 1%-ного раствора иодата калия, перемешивают и охлаждают. Иодат калия окисляет освободившуюся при гидролизе иодоводородную кислоту в свободный иод:

$$5HI + KIO_3 + HNO_3 \rightarrow 3I_2 + KNO_3 + 3H_2O$$

В пробирку добавляют 1—2 мл хлороформа и хорошо встряхивают. После отстаивания слой хлороформа (нижний) окрашивается иодом в фиолетовый цвет.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА АДРЕНАЛИН

Оборудование, реактивы. Штатив лабораторный с пробирками стеклянными химическими; раствор адреналина (содержимое ампулы растворяют в 100 мл воды); иодат калия (1%-ный); уксусная (или ортофосфорная) кислота (10%-ная); хлорид железа (III) (3%-ный); гидроксид аммония (10%-ный); нитритно-молибденовый реактив (5 г нитрита натрия и 5 г молибдата натрия растворяют в 50 мл дистиллированной воды); соляная кислота (конц. и 5%-ная); гидроксид натрия (10%-ный); сульфаниловая кислота (1%-ная); нитрит натрия (5%-ный); карбонат натрия (10%-ный); пирокатехин (0,05%-ный).

Реакция с иодатом калия

К 0,5 мл раствора адреналина прибавляют 1 мл 1%-ного раствора иодата калия, 10 капель 10%-ного раствора уксусной или ортофосфорной кислоты и смесь подогревают до температуры 60—65°С. Появляется интенсивное красно-фиолетовое окрашивание.

Реакция с хлоридом железа (III)

К 0,5 мл раствора адреналина прибавляют 2 мл воды и 1 каплю 3%-ного раствора хлорида железа (III). Содержимое пробирки тотчас же окрашивается в изумрудно-зеленый цвет вследствие образования фенолята железа по гидроксильным группам. От прибавления 1 капли 10%-ного раствора гидроксида аммония окраска переходит в вишнево-красную, а затем коричневую.

Проба с нитритно-молибденовым реактивом

В пробирку наливают 1 мл водного раствора адреналина, 1 мл 5%-ного раствора соляной кислоты, 1 мл нитритно-молибденового реактива и смесь перемешивают. Возникает желто-оранжевая окраска. При добавлении нескольких капель 10%-ного раствора гидроксида натрия появляется малиново-красная окраска, переходящая при внесении нескольких капель концентрированной соляной кислоты в лимонно-желтую.

Диазореакция

В пробирку вносят 1 мл 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты, 1 мл 5%-ного раствора нитрита натрия, 2 мл раствора адреналина и 1 мл 10%-ного раствора карбоната натрия. При взаимодействии адреналина с диазореактивом образуются продукты, окрашенные в красный цвет.

Доказательство наличия ядра пирокатехина в молекуле адреналина

В одну из пробирок наливают 2 мл раствора адреналина, в другую — столько же 0,05%-ного раствора пирокатехина. Затем в обе пробирки добавляют по нескольку капель раствора хлорида железа (III). В обеих пробирках появляется изумрудно-зеленое окрашивание.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АДРЕНАЛИНА

Метод основан на колориметрическом определении интенсивности синего окрашивания, возникающего при взаимодействии адреналина с реактивом Фолина.

Оборудованне, реактивы. Фотоколорнметр; калнброванные пробнркн на 10 мл (2 шт.); пнпеткн на 1 мл (3 шт.), на 5 мл (2 шт.); мерная колба на 25 мл; стандартный раствор адреналнна (в мерную колбу на 25 мл отмеривают 1 мл готового раствора адреналнна н доводят до меткн водой; 1 мл такого раствора содержнт 0,04 мг адреналнна); раствор карбоната натрня (10%-ный); реактнв Фолнна (см. приложенне).

В две калиброванные на 10 мл пробирки вносят пипеткой: в первую — 1 мл стандартного раствора адреналина, во вторую — 1 мл исследуемого раствора. Далее в каждую пробирку добавляют по 4 мл 10%-ного свежеприготовленного раствора карбоната натрия и по 0,5 мл реактива Фолина. Содержимое обеих пробирок встряхивают. Жидкость постепенно окрашивается в синий цвет, достигающий наибольшей интенсивности через 5 мин. Далее объем жидкости в пробирках доводят до метки 10%-ным раствором карбоната натрия. Содержимое пробирок перемешивают и окраску исследуемого раствора сравнивают в колориметре с окраской стандартного раствора адреналина. Расчет ведут по формуле:

$$C = \frac{C_1 \cdot E_1}{E},$$

где C — концентрация адреналина в стандартном растворе; C_1 — концентрация адреналина в испытуемом растворе; E — экстинкция стандартного раствора; E_1 — экстинкция испытуемого раствора.

При необходимости делают пересчет на всю пробу исследуемого раствора и выражают концентрацию адреналина в наиболее подходящей размерности.

Приложение

ПРИГОТОВЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ПРЕПАРАТОВ

1. Активированный уголь. Активированный уголь кипятят с 2 н. раствором соляной кислоты в течение 2—3 ч в колбе с обратным холодильником. Затем смесь охлаждают и уголь отфильтровывают на воронке Бюхнера. Осадок угля переносят в колбу и заливают свежей порцией кислоты. Подобную обработку повторяют трижды. Уголь промывают дистиллированной водой до нейтральной реакции, а затем 1%-ным спиртовым раствором аммиака. В заключение уголь промывают дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод и сушат его в термостате при 105°С. Уголь хранят в склянке с притертой пробкой.

2. Анионит Дауэкс 1·2 (200—400 меш. «в Cl-форме»). Препарат смолы помещают в стакан, заливают 5%-ным раствором хлорида натрия и оставляют стоять на ночь для набухания. Для освобождения смолы от ионов железа и от поглощающих в УФ соединений ее промывают многократно 2 н. раствором соляной кислоты (проба роданидом калия). По достижении отрицательной реакции на железо смолу промывают дистиллированной водой, затем 1 н. раствором гидроксида натрия, опять водой и затем 2 н. раствором соляной кислоты. Эту операцию проводят многократно. В заключение смолу обрабатывают 2 н. раствором соляной кислоты и тщательно промывают водой до нейтральной реакции и до исчезновения хлорид-ионов в промывных водах (проба с $AgNO_3$). После указанной обработки смола готова к употреблению.

3. Ацетат магния (в спирте 95%-ном). 1,61 г ацетата магния растворяют в 100 мл 95%-ного этанола с несколькими кристаллами иода; в 1 мл раствора содержится после прокаливания 3 мг оксида магния. Ацетат магния можно приготовить растворением оксида магния в растворе уксусной кислоты с последующей кристаллизацией полученной соли.

4. Бензидиновый проявитель. 0,5 г основного бензидина растворяют в 80 мл этанола и к раствору добавляют 10 мл 40%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и 10 мл ледяной уксусной кислоты

5. Вата гигроскопическая промытая. Вату кипятят 15—20 мин в дистиллированной воде, фильтруют прямо на воронке и промывают дистиллированной горячей водой до исчезновения реакции на углеводы с фелинговой жидкостью. Вату просушивают и хранят в плотно закрытой банке.

6. Глиоксиловая кислота. К 2 г магния в порошке, слегка увлажненного, приливают при охлаждении 50 мл заранее охлажденного до 0°С насыщенного раствора щавелевой кислоты. Осадок оксалата магния отфильтровывают и промывают небольшой порцией воды. Фильтрат подкисляют уксусной кислотой и доводят водой до объема 200 мл. Раствор сохраняют в холодильнике.

7. Диазореактив. Готовят два раствора: А — 0,9 г сульфаниловой кислоты растворяют в 9 мл концентрированной соляной кислоты и доводят объем до 100 мл; В — 5%-ный раствор нитрита натрия.

Непосредственно перед работой смешивают предварительно охлажденные во льду 1,5 мл раствора А и 1,5 мл раствора В. Через 5 мин добавляют при взбалтывании еще 6 мл раствора В и спустя 1 мин — воду до 500 мл. При хранении во льду раствор пригоден в течение суток.

8. 2,4-Динитрофенилгидразин (0,1%-ный раствор). К 100 мг 2,4-динитрофенилгидразина добавляют постепенно 100 мл разведенной (1 : 4) соляной кислоты до возможно полного растворения его. Раствор фильтруют и хранят в холодильнике.

9. Казеин (для определения изоэлектрической точки). 1 л цельного молока центрифугируют и удаляют сливки. К снятому молоку прибавляют по каплям при непрерывном перемешивании в течение 30 мин около 100 мл 0,5 н. раствора соляной кислоты до pH 4,8. Смесь перемешивают еще 15 мин и дают отстояться в течение 1 ч. Верхний слой декантируют и осадок отделяют на воронке Бюхнера, тщательно промывая его дистиллированной водой. Фильтр с осадком заворачивают в фильтровальную бумагу и обрабатывают эфиром в аппарате Сокслета для удаления жиров. Препарат казеина распределяют тонким слоем на стекле и оставляют под тягой на несколько часов для испарения эфира.

10. Кальций-фосфатный гель. Смешивают 150 мл раствора хлорида кальция (содержит 132 мг $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ в 1 мл) и 1450 мл дистиллированной воды. При энергичном перемешивании добавляют 150 мл раствора фосфата натрия (содержит 152 мг $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ в 1 мл). Доводят pH раствора до 7,4 разведенной уксусной кислотой. Затем смесь переносят в сосуд на 15—20 л, добавляют 10 л дистиллированной воды, перемешивают до получения однородной суспензии и дают отстояться. Верхний, прозрачный слой декантируют, а осадок еще три раза промывают водой. Оставшуюся после промывки суспензию центрифугируют 5—7 мин при 1000 g. Надосадочную жидкость отбрасывают, а к осадку добавляют несколько объемов воды, перемешивают и опять центрифугируют. К отмытому осадку добавляют 3 объема воды, взмучивают его, помещают в темную склянку и оставляют в холодильнике. Через несколько дней слой жидкости над осадком сливают и отбрасывают. В таком виде гель готов к употреблению. Хранят его в холодильнике в темной склянке.

11. Катионит Дауэкс-50 в H^+-форме. Смолу обрабатывают аналогичным образом, как анионит (см. п. 2).

12. Кобальтинитрит натрия. Готовят 2 раствора: А — 25 г нитрата кобальта растворяют в 12,5 мл ледяной уксусной кислоты и 50 мл дистиллированной воды; В — 120 г нитрита натрия растворяют в 180 мл дистиллированной воды. Раствор А переносят в склянку Дрекселя и приливают 210 мл раствора В, хорошо взбалтывая. Отводную трубку присоединяют к водоструйному насосу и через раствор просасывают воздух до исчезновения запаха оксидов азота. При этом раствор просветляется и становится прозрачным. Воздух необходимо продувать в течение нескольких дней по нескольку часов каждый день. Реактив хранят в темном прохладном месте. Перед анализом через него вновь пропускают воздух и нужное количество реактива фильтруют. Раствор годен в течение одного месяца.

13. Крахмал-индикатор. 1 г растворимого крахмала размешивают в 10 мл холодной воды и постепенно вливают в 90 мл кипящего насыщенного раствора хлорида натрия, нагревают до кипения и охлаждают.

14. Магнезиальная смесь. Растворяют в воде 100 г хлорида магния, 200 г хлорида аммония, 20 мл (конц.) раствора аммиака и разбавляют водой до 1 л.

15. Монобромуксусная кислота (0,025%-ный раствор, нейтрализованный гидроксидом калия). В круглодонную колбу на 200—300 мл, снабженную обратным холодильником и капельной воронкой, помещают 12,5 мл ледяной уксусной кислоты, 0,75 г серного цвета и 2—3 кусочка прокаленного пористого фарфора. Колбу нагревают на масляной бане при температуре 130—140°С. Когда уксусная кислота закипит, прибавляют по каплям 11,5 мл сухого брома. (Сухой бром получают путем 2—3-кратного осторожного встряхивания в делительной воронке 15—20 мл брома с 5—7 мл H_2SO_4 (конц.) и последующего отделения слоя брома.) Нагревание продолжают некоторое время для

удаления избытка брома. Содержимое отгоняют под вакуумом, собирая фракцию, кипящую при 117—118°С при остаточном давлении 2666,4 Па. Полученную монобромуксусную кислоту хранят в плотно закрытой склянке, так как она нестойка, очень гигроскопична и сильно разъедает кожу.

16. Мышечная кашица. Охлажденные мышцы свежеубитого животного мелко нарезают ножницами или пропускают через охлажденную мясорубку. Готовят непосредственно перед работой.

17. Насыщенный раствор хлорида сурьмы (III) в хлороформе. Хлорид сурьмы (III) повторно промывают небольшими порциями очищенного хлороформа, пока стекающий раствор не станет бесцветным. Промытый хлорид сурьмы (III) растворяют в очищенном хлороформе до насыщения раствора.

18. Нафторезорциновый реактив. Растворяют 0,2 г нафторезорцина в 100 мл этанола. Готовят 20%-ный водный раствор трихлоруксусной кислоты. Непосредственно перед употреблением смешивают равные объемы двух растворов.

19. Оксид алюминия для колоночной хроматографии. Оксид алюминия прокаливают в фарфоровой чашке в течение 1,5—2 ч.

20. Орциновый реактив. 50 мг $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ растворяют в 250 мл концентрированной соляной кислоты (ρ 1,14 г/см³). Этот раствор хранят в склянке темного стекла под тягой в течение не более одного месяца. Перед опытом к нему добавляют орцин (из расчета на 1 мл раствора 4,76 мг орцина).

21. Пировиноградная кислота. В ступке растирают 120 г гидросульфата калия с 80 г винной кислоты и 40 г промытого соляной кислотой и водой, а затем прокаленного песка. Тщательно измельченную массу переносят в круглодонную колбу (из стекла пирекс) на 750 мл или в реторту на 1 л. Колбу соединяют с нисходящим холодильником и нагревают на масляной бане, поддерживая температуру 210—220°С, до тех пор, пока не прекратится отгонка жидкости. Масса может вспениваться, в этом случае рекомендуется нагревать верхнюю часть колбы голым пламенем горелки и не давать подниматься температуре бани выше 220°С. Полученный дистиллят перегоняют в вакууме, собирая фракцию, перегоняющуюся от 50 до 70°С при давлении 1599,6 Па (12 мм рт. ст.). При вторичной перегонке собирают фракцию, перегоняющуюся при 62°С (давление 1599,6 Па (12 мм рт. ст.) или при 75—80°С (давление 3332,5 Па (25 мм рт. ст.). Выход — 28—30 г.

Пировиноградная кислота легко разлагается, поэтому ее лучше сохранять в виде устойчивой натриевой соли. Для этого пировиноградную кислоту растворяют в 10 объемах этилового спирта. Этот раствор медленно нейтрализуют спиртовым раствором гидроксида натрия (1 объем насыщенного NaOH в 10 объемах спирта). Пируват натрия сразу начинает кристаллизоваться. Кристаллы отфильтровывают на воронке Бюхнера, промывают спиртом и эфиром и высушивают в эксикаторе. Выход — 85%.

22. Рабочий реактив для определения глюкозы энзиматическим методом. К 70—80 мл 0,25 н. ацетатного буфера (pH 4,8) добавляют 2 мг препарата глюкозооксидазы и 1 мг сухой кристаллической пероксидазы. Смесь перемешивают, приливают 1 мл 1%-ного раствора *о*-толидина и доводят объем пробы до 100 мл ацетатным буфером. Реактив готовят за 1—2 ч до употребления. Он может храниться в холодильнике в темных закрытых склянках в течение 1—1,5 месяцев.

23. Раствор гипобромита. 1 г брома растворяют при охлаждении льдом в 50 мл 5%-ного раствора гидроксида натрия. При хранении в холодильнике раствор пригоден для работы в течение двух недель.

24. Раствор дифениламина. 1 г дифениламина, дважды перекристаллизованного из 70%-ного спирта или петролейного эфира, растворяют в смеси 2,75 мл серной кислоты (конц.) и 100 мл ледяной уксусной кислоты.

25. 2,6-Дихлориндофенол (0,001 н. раствор). Взвешивают в бюксе 130 мг реактива и с помощью воронки переносят в мерную колбу на 500 мл, смывая остатки на воронке и в бюксе дистиллированной водой. Добавив 10 капель

0,01 н. раствора гидроксида натрия и воду до половины колбы, раствор сильно перемешивают до растворения 2,6-дихлориндофенола. Объем раствора в колбе доводят до метки водой. Перемешав еще несколько раз, раствор фильтруют в сухую склянку из темного стекла. Реактив устойчив в течение трех суток.

26. Раствор для обнаружения жирных кислот на хроматограмме. 50 мг бромфенолового синего и 200 мг лимонной кислоты растворяют в 100 мл воды.

27. Раствор иода в иодиде квлия (раствор Люголя). Растворяют 1 г иода и 2,5 г иодида калия в 20 мл воды. По растворении объем раствора доводят до 100 мл.

28. Раствор иодида ртути в иодиде калия. 5 г иодида калия растворяют в дистиллированной воде и насыщают раствор 12 г иодида ртути. Объем раствора доводят до 100 мл.

29. Раствор иодата калия (0,001 н.). На аналитических весах отвешивают в бюксе 0,3568 г иодата калия и растворяют в мерной колбе на 1 л. Полученный 0,01 н. раствор по мере надобности разбавляют дистиллированной водой в 10 раз и получают 0,001 н. раствор.

30. Раствор молибдата аммония в азотной кислоте. Смешивают 15%-ный раствор молибдата аммония с азотной кислотой (конц.) в отношении 110 : 90.

31. Раствор молибдата аммония (2,5%-ный) в 5 н. растворе серной кислоты. 25 г молибдата аммония растворяют в мерной колбе в 450 мл воды и после растворения объем раствора доводят водой до 500 мл. В мерной колбе на 1 л смешивают 139 мл серной кислоты (конц., ρ 1,84 г/см^3) с 350 мл воды. По охлаждении туда же вливают приготовленный раствор молибдата аммония, перемешивают и после охлаждения доводят объем раствора водой до метки.

32. Раствор флороглюцина. Растворяют 0,2 г флороглюцина в 100 мл 30%-ной соляной кислоты.

33. Раствор фуксинсернистой кислоты. Растворяют 1 г основного фуксина в 200 мл кипящей дистиллированной воды, встряхивают в течение 5 мин и после этого охлаждают точно до 50°С. Фильтруют раствор и к фильтрату добавляют 20 мл 1 н. раствора соляной кислоты. Охлаждают до 25°С и добавляют 1 г метабисульфита натрия или калия. Раствор оставляют в темном месте на 14—24 ч, добавляют 2 г активированного угля и встряхивают в течение 1 мин. Фильтруют. Хранят в темноте при 0—4°С. Перед употреблением доводят до комнатной температуры.

34. Раствор эйконогена. 0,25 г эйконогена, 15 г метабисульфита натрия и 0,5 г безводного сульфита натрия растворяют в 100 мл подогретой воды. После растворения рвствор отфильтровывают и сохраняют в темной посуде. Перед употреблением необходимое количество раствора разбавляют в 5 раз водой.

35. Реактив Бврфеда. 13,3 г ацетата меди растворяют в 200 мл горячей воды. Фильтруют и к фильтрату прибавляют 1,9 мл ледяной уксусной кислоты.

36. Реактив Миллона. Одну часть ртути растворяют в двойном по массе количестве азотной кислоты (ρ 1,40 г/см^3) сначала на холоду, затем на водяной бане. Полученный раствор разбавляют двойным объемом воды.

37. Реактив «Нади». Смешивают в равных объемах 1%-пый спиртовой раствор α-нафтола, 1%-ный раствор диметилпарафенилендиамина и 1,5%-ный раствор карбоната натрия. Реактив быстро изменяется при хрвнении, поэтому работают со свежеприготовленным.

38. Реактив Несслера. Растворяют 50 г иодида калия в 50 мл воды и добавляют горячий концентрированный раствор хлорида ртути (II) до прекращения растворения образующегося при сливании растворов осадка. Далее добавляют раствор гидроксида калия (180 г KOH в 300 мл воды), доводят водой до 1000 мл и вносят еще 5 мл раствора хлорида ртути (II). Дают отстояться и с осадка сливают прозрачный раствор. Полученный раствор K_2HgI_4 хранят в темной склянке.

39. Реактив Ниландера. 2 г основного нитрата висмута и 4 г сегнетовой соли растворяют, нагревая на кипящей водяной бане, в 100 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия. Охлаждают и отфильтровывают от выпавшего осадка.

40. Реактив Селиванова. 0,05 г резорцина растворяют в 100 мл разбавленной соляной кислоты (1 : 1).

41. Реактив Фолина. 100 г $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ и 25 г $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ растворяют в 700 мл воды в круглодонной колбе на 1 л, снабженной пришлифованным холодильником Либиха. Прибавляют 50 мл 85%-ной фосфорной кислоты и 100 мл соляной кислоты (конц.). Помещают в колбу несколько капилляров. Смесь кипятят в колбе с обратным холодильником в течение 10 ч. Далее прибавляют 150 г сульфата лития, 50 мл воды и несколько капель брома. Не пользуясь более обратным холодильником, кипятят содержимое колбы в течение 15 мин для удаления избытка брома (под тягой). Раствор охлаждают, доводят водой до объема 1 л и фильтруют через стеклянный фильтр. Хранят реактив Фолина в склянке темного стекла.

Все реактивы, используемые для приготовления реактива Фолина, должны быть химически чистыми. На всех этапах приготовления реактива цвет реакционной смеси должен быть желтым. При наличии зеленого оттенка реакционной смеси необходимо провести очистку используемых реактивов. Чаще всего неудовлетворительные результаты зависят от примеси катионов в соляной кислоте, которую рекомендуется предварительно очистить перегонкой и насытить далее хлороводородом до плотности 1,18.

Реактив Фолина титруют 1 н. раствором щелочи и на основании полученных данных рассчитывают его кислотность. Перед употреблением реактив Фолина разбавляют водой до кислотности, соответствующей 1 н. раствору соляной кислоты.

42. Реактив Эрлиха. 10 г N,N-диметил-*п*-аминобензальдегида растворяют в 12,5 мл 10 н. раствора соляной кислоты и добавляют 87,5 мл ледяной уксусной кислоты. Перед работой реактив разбавляют девятью частями ледяной уксусной кислоты.

43. РНК дрожжевая, очистка продажного препарата. 5 г РНК растворяют в 50 мл 0,1 М ацетатного буфера (pH 5,2) и диализуют в течение ночи на холоду против этого буфера. Затем РНК осаждают двойным объемом 96%-ного этанола и осадок отделяют центрифугированием в течение 45 мин при 1800 *g*. Полученный осадок РНК промывают 96%-ным этанолом и эфиром и высушивают в вакуум-эксикаторе.

44. Роданбромидный раствор. В колбочку вносят 10 мл 0,1 н. раствора роданида калия или роданида аммония, 1 г кристаллического бромида калия и 1 мл 17%-ного раствора соляной кислоты. Осторожно (*под тягой*, по каплям) прибавляют 2 мл брома. Раствор используют немедленно после приготовления.

45. Смешанный индикатор. Основной раствор: смешивают 100 мл 0,1%-ного спиртового раствора метилового красного с 25 мл 0,1%-ного спиртового раствора метиленовой сини. Раствор хранят в темной склянке. Рабочий раствор: 1 объем основного раствора смешивают с 1 объемом спирта и 2 объемами воды.

46. Спиртовой раствор гидроксида калия (0,5 н.) Этиловый спирт обрабатывают небольшим количеством измельченного перманганата калия или прибавляют по каплям насыщенный раствор перманганата калия до тех пор, пока окраска не перестанет быстро исчезать, а затем перегоняют спирт в присутствии карбоната кальция для связывания кислот. Первые порции перегоняемого спирта отбрасывают. 30 г химически чистого гидроксида калия растворяют в 30 мл прокипяченной дистиллированной воды, после чего дополняют до 1 л 95%-ным очищенным спиртом. Закрывают колбу пробкой, имеющей трубку с натронной известью. Раствор отстаивают сутки или более от выпадающего осадка карбоната калия, после чего раствор сифонируют в склянку темного стекла, освобожденную от углекислого газа. Склянку закрывают пробкой, снабженной трубкой с натронной известью.

47. Стандартный раствор азобензола. 0,1450 г чистого взобензола (перекристаллизованного из спирта и высушенного) растворяют в мерной колбе на 100 мл в 96%-ном этиловом спирте и доводят спиртом до метки. Перед работой исходный раствор разбавляют в 10 раз 96%-ным этиловым спиртом. Раствор взобензола хранят в темноте.

48. Стандартный раствор глюкозы для определения амилазы. 200 мг чистой глюкозы растворяют в 1 л насыщенного раствора пикриновой кислоты.

49. Стандартный раствор для определения холестерола. 100 мг холестерола растворяют в мерной колбе на 100 мл. 1,5 и 10 мл переносят пипетками в колбы на 100 мл и разводят хлороформом до метки.

50. Стандартный раствор марганца. К 91 мл 1 н. раствора перманганата калия (титр перманганата калия устанавливают по щавелевой кислоте) прибавляют 300 мл дистиллированной воды, 3 мл серной кислоты (конц.) и по каплям 6 мл 10%-ного раствора сульфита натрия. Раствор кипятят до исчезновения запаха оксида серы (IV), охлаждают, переносят в колбу на 1 л и доводят водой до метки. Содержание марганца в стандартном растворе составляет 100 мкг/мл.

51. Стандартный раствор мочевой кислоты. 100 мг чистой, хорошо высушенной в эксикаторе мочевой кислоты заливают раствором, содержащим 200 мг гидрофосфата натрия и 400 мг дигидрофосфата натрия. Смесь подогревают до растворения солей и по охлаждении доводят водой до 200 мл.

52. Стандартный раствор фосфата. 0,1099 г KH_2PO_4 растворяют в мерной колбе на 1 л. В 1 мл этого раствора содержится 0,025 мг фосфора. В качестве антисептика к раствору добавляют 2—3 капли хлороформа.

53. Стандартная смесь аминокислот. Для приготовления стандартной смеси аминокислот любого состава необходимо иметь 0,1 М растворы всех постоянно встречающихся в белках аминокислот. Навеску каждой аминокислоты, необходимую для приготовления 10 мл 0,1 М раствора, берут во взвешенную склянку из-под пенициллина. Приливают 10 мл 10%-ного раствора изопропилового спирта и, если аминокислота не растворяется, добавляют по каплям 20%-ный раствор соляной кислоты до полного растворения навески. Склянку с раствором взвешивают и содержание аминокислоты рассчитывают в микрограммах на 1 г раствора. Полную стандартную смесь аминокислот для хроматографии готовят, смешивая по 0,1 мл двадцати исходных растворов аминокислот. Если для работы необходима неполная стандартная смесь, то после смешивания необходимых растворов аминокислот объем смеси доводят до 2 мл 10%-ным раствором изопропилового спирта, содержащим 1% соляной кислоты

54. Субстратный раствор для определения активности ДНКазы. Субстратный раствор состоит из 1 мл раствора натриевой соли ДНК (2 мг в 1 мл), 1 мл 0,1 М раствора сульфата натрия и 0,4 мл раствора фенолового красного. 2,4 мл этого раствора доводят до pH 7,55 добавлением 0,01 н. раствора гидроксида натрия и разбавляют водой до объема 3 мл. pH субстратного раствора проверяют путем сравнения с окраской стандартного раствора, состоящего из 0,4 мл раствора фенолового красного и 2,6 мл $^1/_{15}$ М фосфатного буфера pH 7,55.

55. Толуол, насыщенный водой. Смешивают равные объемы перегнанного толуола и дистиллированной воды. Встряхивают энергично в делительной воронке, дают отстояться. Верхний слой берут для работы.

56. Фелингова жидкость. Готовят два раствора. А — 34,6 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ в 500 мл раствора; В — 173 г сегнетовой соли и 70 г гидроксида натрия в 500 мл раствора. Растворы хранят раздельно. Перед употреблением смешивают равные объемы первого и второго раствора.

57. Фенол, свежеперегнанный и водонасыщенный. Обычно кристаллический фенол имеет розовый цвет, и перед употреблением его перегоняют. Фенол в широкогорлой стеклянной посуде расплавляют на водяной бане при температуре 45°C. Расплавленный фенол переливают в колбу Вюрца. Горло колбы закрывают пробкой с термометром на 250°C, к боковому отростку присоединяют приемную колбу и закрепляют ее в наклонном положении.

Нагревание ведут на электрической плитке. Отбирают фракцию, кипящую при 181—183°С. Остаток в колбе Вюрца (высшие фенолы и гудрон) отбрасывают. Необходимо следить, чтобы в конце перегонки не начали перегоняться крезольноксиленовые примеси, которые быстро отгоняются при 200—230°С и вызывают порозовение свежеперегнанного фенола.

К свежеперегнанному теплому, бесцветному фенолу прибавляют воду (на 100 мл фенола 25 мл воды при комнатной температуре). Насыщение водой продолжают до появления мути, не исчезающей при встряхивании. Для получения фенола с pH 6,0 к 100 мл водонасыщенного фенола прибавляют 0,4 мл 1 н. раствора гидроксида калия. Для получения раствора фенола с pH 8,3 к 100 мл водонасыщенного фенола прибавляют 3 мл 5 н. раствора гидроксида калия. К полученным растворам снова добавляют воду до насыщения ею фенола (около 10 мл на 1 л раствора).

58. Ф е н о л о в ы й к р а с н ы й (0,01%-ный раствор). В мерной колбе на 100 мл смешивают 10 мг фенолсульфофталеина, 0,28 мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия, 3 мл 96%-ного этанола, 40 мл $^1/_{15}$ М фосфатного буфера, pH 7,55, после чего доводят объем до метки водой.

59. 0,2 М ф о с ф а т н ы й б у ф е р н ы й р а с т в о р (pH 7,2). Растворяют 7,62 г первичного фосфата калия и 20,45 г безводного вторичного фосфата натрия в мерной колбе на 1 л в некотором количестве воды и по растворении доводят водой до метки.

60. Ф о с ф о р н о - в о л ь ф р а м о в ы й р е а к т и в. 10 г вольфрамата натрия, 8 мл 85%-ной фосфорной кислоты и 90 мл воды кипятят в течение 2 ч в колбе с обратным холодильником. После охлаждения доводят объем до 100 мл водой.

61. Ф р у к т о з о - 1, 6-д и ф о с ф а т н а т р и е в а я с о л ь. 200 г бариевой соли фруктозо-1,6-дифосфата растворяют в 300 мл 2 н. раствора соляной кислоты и барий осаждают высчитанным количеством 20% ного раствора сульфата натрия. После отделения сульфата бария pH раствора доводят 50%-ным раствором гидроксида натрия до 9. Выпадающий при этом небольшой осадок отделяют и раствор обрабатывают при комнатной температуре 20 г угля в течение 1 ч. Уголь удаляют фильтрованием, а фильтрат доводят соляной кислотой (конц.) до pH 7,0 Прибавляют двойной объем спирта, выпавшее сиропообразное вещество промывают 3 раза спиртом и растворяют в воде в отношении 1 : 4 (по массе). Из 200 г бариевой соли получают 520 мл 10%-ного раствора натриевой соли фруктозо-1,6-дифосфата. Путем разливки в ампулы и лиофильной сушки 10%-ного раствора получают сухой препарат.

62. Х л о р о ф о р м (очистка). Хлороформ встряхивают на качалке с половинным объемом воды, сменяемой 5—6 раз. Отделив последний раз от воды, хлороформ встряхивают с концентрированной серной кислотой (100 : 5), заменяя кислоту на свежую, пока она не перестанет окрашиваться. После этого хлороформ многократно промывают водой, энергично встряхивая в делительной воронке. По отделении от воды высушивают безводным карбонатом калия, но не хлоридом кальция и ни в коем случае не металлическим натрием *(произойдет взрыв!)*. После высушивания хлороформ перегоняют лучше над оксидом фосфора (V), собирая фракцию при 61,2°С.

63. А м м и а ч н ы й р а с т в о р г и д р о к с и д а с е р е б р а. К 2—4 мл 1%-ного раствора нитрата серебра прибавляют 1—2 капли 5%-ного раствора гидроксида аммония. Появляющийся сначала белый осадок быстро становится бурым — образуется оксид серебра. К смеси при встряхивании продолжают каплями приливать 5%-ный раствор гидроксида аммония до растворения образовавшегося осадка. При этом образуется так называемый аммиачный раствор гидроксида серебра.

Плотность растворов сильных кислот

Плотность при $\frac{15°C}{4°C}$	Массовая доля (в %)			Плотность при $\frac{15°C}{4°C}$	Массовая доля (в %)		Плотность при $\frac{15°C}{4°C}$	Массовая доля (в %)
	HCl	HNO_3	H_2SO_4		HNO_3	H_2SO_4		H_2SO_4
1,00	0,16	0,10	0,09	1,30	47,49	39,19	1,60	68,51
1,01	2,14	1,90	1,57	1,31	49,07	40,35	1,61	69,43
1,02	4,13	3,70	3,03	1,32	50,71	41,50	1,62	70,32
1,03	6,15	5,50	4,49	1,33	52,37	42,66	1,63	71,16
1,04	9,16	7,26	5,96	1,34	54,07	43,74	1,64	71,99
1,05	10,17	9,99	7,37	1,35	55,79	44,82	1,65	72,82
1,06	12,18	10,68	8,77	1,36	57,57	45,88	1,66	73,64
1,07	14,17	12,33	10,19	1,37	59,39	46,94	1,67	74,51
1,08	16,15	13,95	11,60	1,38	61,27	48,00	1,68	75,42
1,09	18,11	15,53	12,99	1,39	63,23	49,06	1,69	76,30
1,10	20,01	17,11	14,35	1,40	65,30	50,11	1,70	77,17
1,11	21,92	18,67	15,71	1,41	67,50	51,15	1,71	78,04
1,12	23,82	20,23	17,01	1,42	69,80	52,15	1,72	78,92
1,13	25,75	21,77	18,31	1,43	72,17	53,11	1,73	79,80
1,14	27,66	23,31	19,61	1,44	74,68	54,07	1,74	80,68
1,15	29,57	24,84	20,91	1,45	77,28	55,03	1,75	81,56
1,16	31,52	26,36	22,19	1,46	79,98	55,97	1,76	82,44
1,17	33,46	27,80	23,47	1,47	82,90	56,90	1,77	83,51
1,18	35,39	29,38	24,76	1,48	86,05	57,83	1,78	84,50
1,19	37,23	30,88	26,04	1,49	89,60	58,74	1,79	85,70
1,20	39,11	32,36	27,32	1,50	94,09	59,70	1,80	86,92
1,21		33,82	28,58	1,51	98,10	60,65	1,81	88,30
1,22		35,28	29,84	1,52	99,67	61,59	1,82	90,05

Продолжение

Плотность при $\frac{15°C}{4°C}$	Массовая доля (в %)			Плотность при $\frac{15°C}{4°C}$	Массовая доля (в %)		Плотность при $\frac{15°C}{4°C}$	Массовая доля (в %)
	HCl	HNO_3	H_2SO_4		HNO_3	H_2SO_4		H_2SO_4
1,23		36,78	31,11	1,53		62,53	1,83	92,10
1,24		38,29	32,28	1,54		63,43	1,84	95,60
1,25		39,82	33,43	1,55		64,26	1,841	96,38
1,26		41,34	34,57	1,56		65,08	1,8415	97,70
1,27		42,87	35,71	1,57		65,90	1,8400	99,20
1,28		44,41	36,87	1,58		66,71	1,839	99,70
1,29		45,95	38,03	1,59		67,59		

Иногда удобнее знать не массовую долю (в %), а число граммов кислоты в 1 *л* раствора. Эту величину легко рассчитать по формуле:

$$\frac{1000 \cdot \rho \cdot p}{100},$$

где ρ — плотность, *p* — массовая доля (в %), рассчитать также и нормальность (н.) раствора кислоты, разделив полученную величину на эквивалент кислоты (*Э*):

$$\frac{1000 \cdot \rho \cdot p}{100 \cdot Э}$$

БУФЕРНЫЕ СМЕСИ

1. Ф о с ф а т н о - ц и т р а т н а я б у ф е р н а я с м е с ь составляется из двух растворов: 0,1 М раствора, приготовленного из 21,018 г моногидрата лимонной кислоты и 0,2 М раствора гидрофосфата натрия, приготовленного из 35,598 г $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$.

Смешиванием различных объемов того и другого раствора получают растворы с различным значением pH.

Лимонная кислота (в мл)	Гидрофосфат натрия (в мл)	pH	Лимонная кислота (в мл)	Гидрофосфат натрия (в мл)	pH	Лимонная кислота (в мл)	Гидрофосфат натрия (в мл)	pH
19,60	0,40	2,2	11,72	8,28	4,2	6,78	13,22	6,2
18,76	1,24	2,4	11,18	8,82	4,4	6,15	13,85	6,4
17,82	2,18	2,6	10,65	9,35	4,6	5,45	14,55	6,6
16,83	3,17	2,8	10,14	9,86	4,8	4,55	15,45	6,8
15,89	4,11	3,0	9,70	10,30	5,0	3,63	16,47	7,0
15,06	4,94	3,2	9,28	10,72	5,2	2,61	17,39	7,2
14,30	5,70	3,4	8,85	11,15	5,4	1,83	18,17	7,4
13,56	6,44	3,6	8,40	11,60	5,6	1,27	18,73	7,6
12,90	7,10	3,8	7,91	12,09	5,8	0,85	19,15	7,8
12,29	7,71	4,0	7,37	12,63	6,0	0,55	19,45	8,0

2. Ф о с ф а т н а я б у ф е р н а я с м е с ь составляется из двух растворов: $^1/_{15}$ М гидрофосфата натрия (11,876 г $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) и $^1/_{15}$ М дигидрофосфата калия, содержащего в 1 л раствора (9,078 г KH_2PO_4).

Смешиванием различных объемов того и другого раствора получают растворы с различным значением pH.

Na_2HPO_4 (в мл)	KH_2PO_4 (в мл)	pH	Na_2HPO_4 (в мл)	KH_2PO_4 (в мл)	pH
0,00	10,00	4,49	6,00	4,00	6,98
0,10	9,90	4,94	7,00	3,00	7,17
0,25	9,75	5,29	8,00	2,00	7,38
0,50	9,50	5,59	9,00	1,00	7,73
1,00	9,00	5,91	9,50	0,50	8,04
2,00	8,00	6,24	9,75	0,25	8,34
3,00	7,00	6,47	9,90	0,10	8,67
4,00	6,00	6,64	10,00	0,00	9,18
5,00	5,00	6,81			

3. Ацетатный буфер (0,2 М, pH 3,6—5,8).

Ацетат натрия, 0,2 М раствор (в мл)	Уксусная кислота, 0,2 М раствор (в мл)	pH при 18°С
0,75	9,25	3,6
1,20	8,80	3,8
1,80	8,20	4,0
2,65	7,35	4,2
3,70	6,30	4,4
4,90	5,10	4,6
5,90	4,10	4,8
7,00	3,00	5,0
7,90	2,10	5,2
8,60	1,40	5,4
9,10	0,90	5,6
9,40	0,60	5,8

4. Фосфатный буфер (0,1 М; pH 5,8—8,0).

Na_2HPO_4, 0,2М раствор в (мл)	NaH_2PO_4, 0,2М раствор (в мл)	Вода (в мл)	pH
8,0	92,0	до 200	5,8
12,3	87,7	» »	6,0
18,5	81,5	» »	6,2
26,5	73,5	» »	6,4
37,5	62,5	до 200	6,6
49,0	51,0	» »	6,8
61,0	39,0	» »	7,0
72,0	28,0	» »	7,2
81,0	19,0	» »	7,4
87,0	13,0	» »	7,6
91,5	8,5	» »	7,8
94,7	5,3	» »	8,0

5. Глицил-глициновый буфер. Для приготовления 0,25 М и 0,07 М растворов глицил-глицина (pH 7,5) рассчитанную навеску (33 и 9,24 г соответственно) растворяют в 500 мл бидистиллированной воды. pH измеряют на потенциометре со стеклянным электродом, после чего добавляют небольшими порциями 2 М раствор щелочи. Когда значение водородного показателя станет близким к требуемому, его доводят до более точного значения постепенным добавлением небольших количеств 0,2 М раствора щелочи. После достижения требуемой величины pH общий объем буферного раствора доводят водой до 1 л.

Характеристика некоторых индикаторов

Тривиальная номенклатура	Рациональная химическая номенклатура	Индикаторный интервал pH	Окраска в указанных пределах pH	Растворитель и концентрация
Тимоловый синий (1-й переход)	Тимолсульфофталеин	1,2—2,8	Красная — желтая	а) 100 мг + 4,3 мл 0,05 н. раствора NaOH+вода до 100 мл, б) 0,1% в 20%-ном спирте
Крезоловый красный (1-й переход)	*м*-Крезолсульфофталеин	1,9—3,1	Оранжевая — желтая	а) 100 мг+5,3 мл 0,05 н. раствора NaOH+вода до 100 мл, б) 0,1% в 20%-ном спирте
Метиловый оранжевый	Диметиламиноазобензолсульфонат натрия	3,1—4,4	Красная — оранжево-желтая	0,1% в воде
Бромфеноловый синий	Тетрабромфенолсульфофталеин	3,0—4,6	Желтая — синяя	а) 100 мг+3 мл 0,05 н. раствора NaOH+вода до 100 мл, б) 0,1% в 20%-ном спирте
Бромкрезоловый синий (зеленый)	Тетрабромфенол-*м*-крезолсульфофталеин	3,8—5,4	Желтая — синяя	а) 100 мг+2,9 мл 0,05 н. раствора NaOH+вода до 100 мл, б) 0,1% в 20%-ном спирте
Метиловый красный	Диметиламинобензолазобензоат натрия	4,2—6,2	Красная — желтая	0,1% в воде или 60%-ном спирте
Хлорфеноловый красный	Дихлорфенолсульфофталеин	4,8—6,4	Желтая — красная	а) 100 мг+4,7 мл 0,05 н. раствора NaOH+вода до 100 мл, б) 0,1% в 20%-ном спирте
Бромтимоловый синий	Дибромтимолсульфофталеин	6,0—7,6	Желтая — синяя	а) 100 мг+3,2 мл 0,05 н. раствора NaOH+вода до 100 мл, б) 0,05% в 20%-ном спирте
Феноловый красный	Фенолсульфофталеин	6,4—8,0	Желтая — красная	а) 100 мг+5,7 мл 0,05 н. раствора NaOH+вода до 100 мл, б) 0,1% в 20%-ном спирте
Крезоловый красный (2-й переход)	*м*-Крезолсульфофталеин	7,4—9,0	Янтарно-желтая — пурпурно-красная	а) 100 мг+5,3 мл 0,05 н. раствора NaOH+вода до 100 мл, б) 0,1% в 20%-ном спирте
Тимоловый синий (2-й переход)	Тимолсульфофталеин	0,8—9,6	Желтая — синяя	а) 100 мг+4,3 мл 0,05 н. раствора NaOH+вода до 100 мл, б) 0,1% в 20%-ном спирте

Тривиальная номенклатура	Рациональная химическая номенклатура	Индикаторный интервал pH	Окраска в указанных пределах pH	Растворитель и концентрация
Фенолфталеин	Фенолфталеин	8,2—10,0	Бесцветная — малиново-красная	0,1% в 90%-ном спирте
Тимолфталеин	Тимолфталеин	9,3—10,5	Бесцветная — синяя	0,1% в 90%-ном спирте
Ализариновый желтый	*n*-Нитроанилиназосалицилат натрия	10,1—12,1	Желтая — фиолетовая	0,1% в воде

Адреса грензаводов и шелкомотальных фабрик

I. Грензаводы

1. Георгиевск, Ставропольского края, ул. Фрунзе, 1.
2. Фергана, Узбекской ССР, ул. Ахундова, 19. Грензавод № 1.

II. Шелкомотальные фабрики

1. Дюшанбе, ул. Ахмади Дониш; 5. Дюшанбинский шелковый комбинат.
2. Маргелан, Узбекской ССР, ул. Кирова, 1. Шелковый комбинат.
3. Киев, ул. Фрунзе, 60. Шелковый комбинат.

Зависимость между показателем преломления и концентрацией белка в растворе

Показатель преломления с точностью до тысячной	Концентрация белка (в %) при показателе преломления с точностью до десятитысячной									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1,337	0,60	0,66	0,72	0,77	0,83	0,89	0,95	1,01	1,07	1,12
1,338	1,18	1,24	1,30	1,36	1,41	1,47	1,53	1,59	1,65	1,70
1,339	1,76	1,82	1,88	1,94	2,00	2,05	2,11	2,17	2,23	2,29
1,340	2,34	2,40	2,46	2,52	2,58	2,63	2,69	2,75	2,81	2,87
1,341	2,93	2,98	3,04	3,10	3,16	3,22	3,27	3,33	3,39	3,46
1,342	3,51	3,57	3,62	3,68	3,74	3,80	3,86	3,91	3,97	4,03
1,343	4,09	4,15	4,20	4,26	4,32	4,38	4,44	4,50	4,55	4,61
1,344	4,67	4,73	4,79	4,84	4,90	4,96	5,02	5,08	5,13	5,19
1,345	5,25	5,31	5,37	5,43	5,48	5,54	5,60	5,66	6,72	5,77
1,346	5,83	5,89	5,95	6,01	6,07	6,12	6,18	6,24	6,30	6,36
1,347	6,41	6,47	6,53	6,59	6,65	6,70	6,76	6,82	6,88	6,94
1,348	7,00	7,05	7,11	7,17	7,23	7,29	7,34	7,40	7,46	7,52
1,349	7,58	7,63	7,69	7,75	7,81	7,87	7,93	7,98	8,04	8,10
1,350	8,16	8,22	8,27	8,33	8,39	8,46	8,51	8,57	8,62	8,68
1,351	8,74	8,80	8,86	8,91	8,97	9,03	9,09	9,15	9,20	9,26
1,352	9,32	9,38	9,44	9,50	9,55	9,61	9,67	9,73	9,79	9,84
1,353	9,90	9,96	10,02	10,08	10,13	10,19	10,25	10,31	10,37	10,43
1,354	10,48	10,54	10,60	10,66	10,72	10,77	10,83	10,89	10,95	11,01
1,355	11,06	11,12	11,18	11,23	11,29	11,35	11,41	11,47	11,52	11,58
1,356	11,64	11,70	11,76	11,81	11,87	11,93	11,99	12,05	12,10	12,16
1,357	12,22	12,28	12,34	12,39	12,45	12,51	12,57	12,63	12,68	12,74
1,358	12,80	12,86	12,92	12,97	13,03	13,09	13,15	13,21	13,26	13,32
1,359	13,38	13,44	13,50	13,55	13,61	13,67	13,73	13,79	13,84	13,90
1,360	13,96	14,02	14,08	14,13	14,19	14,25	14,31	14,37	14,42	14,48

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Аналитические методы белковой химии: Сборник / Пер. с англ. Под ред. Александера и Блока. — М.: Изд-во иностр. лит., 1963.

Асатиани В. С. Биохимический анализ, ч. I, разд. II. Тбилиси, Изд-во «Цодна», 1964.

Асатиани В. С. Новые методы биохимической фотометрии. — М.: Наука, 1965.

Асатиани В С. Ферментные методы анализа. — М.: Наука, 1969.

Аймухамедова Г. Б., Шелухина Н. Г. Пектиновые вещества и методы их определения. Фрунзе, Илим, 1964.

Белозерский А. Н., Проскуряков Н. И. Практическое руководство по биохимии растений. — М.: Советская наука, 1951.

Березов Т. Т. Практикум по биохимии животных и человека. — М.: Изд-во Университета им. П. Лумумбы, 1967.

Биохимические методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. Покровского А. А. — М.: Медицина, 1969.

Биохимические методы анализа растений / Пер. с нем. Под ред. М. Н. Запрометова. М., Изд-во иностр. лит., 1960.

Васильев В. К. Определение нуклеотидного состава ДНК с помощью тонкослойной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе: Научные доклады высшей школы / Серия биологические науки, № 9, с. 118—120, 1971.

Детерман Г. Гельфильтрация. — М.: Мир, 1971.

Дроздов Н. С., Материкская Н П. Практикум по биологической химии. — М.: Высшая школа, 1970.

Жданов Ю. А. и др. Практикум по химии углеводов. — М.: Росвузиздат, 1963.

Ивченко Г. М., Кушманова О. Д. Руководство к практическим занятиям по биологической химии. — М.: Медицина, 1966.

Инихов Г. С., Брио Н. П. Методы анализа молока и молочных продуктов. — М.: Пищевая промышленность, 1971.

Кельман Л., Лясковская Ю. Ускоренный метод выделения и количественного определения липидов мышечной ткани. — Мясная индустрия СССР, 1965, № 1, с. 52.

Ковальский В. В., Гололобов А. Д. Методы определения микроэлементов в органах и тканях животных, растений и почвах. — М.: Колос, 1969.

Конарев В Г., Тютерев С. Л. Методы биохимии и цитохимии нуклеиновых кислот растений. — Л.: Колос, 1970.

Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. — М.: Высшая школа, 1971.

Методы биохимического исследования растений: Сборник / Под ред. А. И. Ермакова. — Л.: Колос, 1972.

Методы исследования нуклеиновых кислот / Пер. с англ. Под ред. акад. А. Н. Белозерского. — М.: Мир, 1970.
Методы химии углеводов / Пер. с англ. Под ред. Н. К. Кочеткова. — М.: Мир, 1967.
Ольшанова К. М., Потапова М. А., Морозова Н. М. Практикум по хроматографическому анализу. — М.: Высшая школа, 1970.
Павленко Л. Н. Сб. Витамины и гормоны. К., «Наук. думка», вып. 6, 1971.
Петров К. П. Практикум по биохимии пищевого растительного сырья. — М.: Пищевая промышленность, 1965.
Петрунькина А. М. Практическая биохимия. — Л.: Медгиз, 1961.
Прохорова М. И., Тупикова З. Н. Большой практикум по углеводному и липидному обмену. Изд-во ЛГУ, 1965.
Рунькис Г. Я. Методы ускоренного колориметрического определения микроэлементов в биологических объектах. Рига, Изд-во АН Латв. ССР, 1963.
Савронь Е. С. Практикум по биохимии животных. — М.: Высшая школа, 1967.
Сборник методических разработок к спецпрактикуму по химии белка и нуклеиновых кислот / Под ред. чл.-кор. АН СССР М. А. Прокофьева и доц. А. А. Богданова. Изд-во МГУ, 1971.
Сквирская Э. Б., Чепинога О. П. Практикум по нуклеопротеидам и нуклеиновым кислотам. — М.: Высшая школа, 1964.
Современные методы в биохимии: Сборник / Под ред. В. Н. Ореховича. — М.: Медицина, т. 1, 1964; т. II, 1968.
Филиппович Ю. Б. Общая биохимия. — М.: Высшая школа, 1969.
Шарпенак А. Э., Кондышев В. А. Практикум по биологической химии. — М.: Высшая школа, 1969.
Шапиро Д. К. Практикум по биологической химии. Минск, Высшая школа, 1972.
Химия и биохимия нуклеиновых кислот / Под ред. И. Б. Збарского, С. С. Дебова. — Л.: Медицина, 1968.
Щербаков В. П. и др. Обнаружение белка, кодируемого геном r-II фага Т 4, методом электрофореза в градиенте плотности полиакриламидного геля. Молекулярная биология, 4, вып. 6, 681, 1970.
Bradford M. A. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilising the Principle of Protein — Dye Binding. Analytical Biochemistry, vol. 72, pp. 248—254, 1976.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Юрий Борисович ФИЛИППОВИЧ
Татьяна Алексеевна ЕГОРОВА
Галина Андреевна СЕВАСТЬЯНОВА

ПРАКТИКУМ ПО ОБЩЕЙ БИОХИМИИ

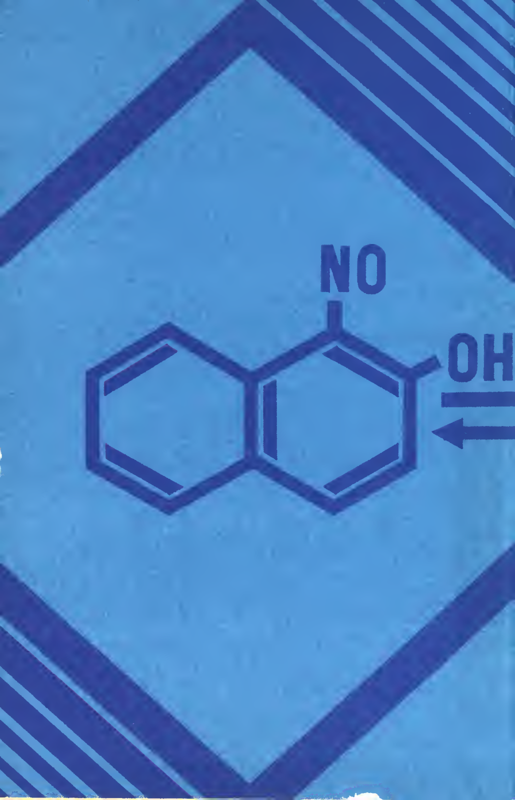
Редактор *Т. В. Александрова*
Художественный редактор *Л. Г. Бакушева*
Технические редакторы *С. Н. Терехова,*
М. М. Широкова
Корректоры *А. А. Гусельникова, Л. П. Михеева*

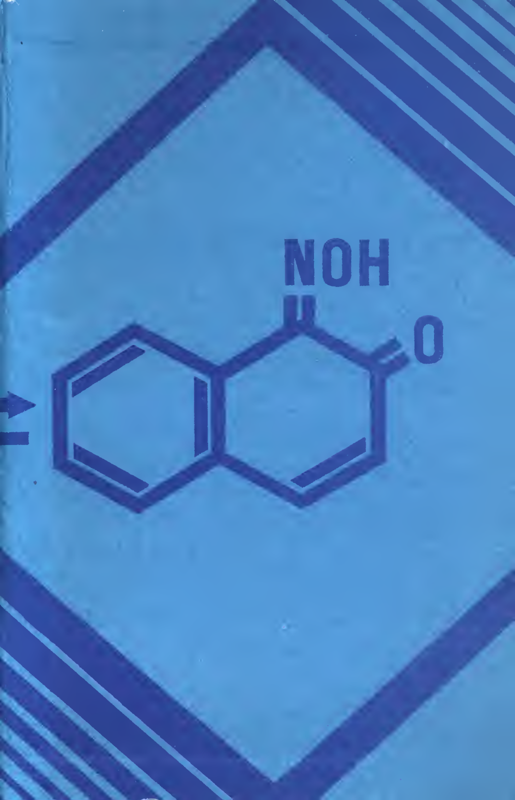
ИБ № 5538

Сдано в набор 12.11.81. Подписано к печати 11.05.82. $60 \times 90^1/_{16}$. Бумага типографская № 3. Гарнитура литер. Печать высокая. Усл. печ. л. 19,50+0,25 печ. л. фор. Усл. кр.-отт. 20,19. Уч-изд. л. 20,36+0,41 фор. Тираж 25 000 экз. Заказ № 238. Цена 80 коп.

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Просвещение» Государственного комитета РСФСР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. Москва, 3-й проезд Марьиной рощи, 41.

Саратовский ордена Трудового Красного Знамени полиграфический комбинат Росглавполиграфпрома Государственного комитета РСФСР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. Саратов, ул. Чернышевского, 59.


NO
OH


NOH
O

80 коп.

ПРАКТИКУМ ПО ОБЩЕЙ БИОХИМИИ